

THESIS

MARBURG

1968

Vergleichende Untersuchungen
über die Brauchbarkeit der Methoden
zur Anfärbung von Spermatozoen in Spermaflecken

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Justus Engelhardt
aus Hamburg

Marburg 1968

**Vergleichende Untersuchungen
über die Brauchbarkeit der Methoden
zur Anfärbung von Spermatozoen in Spermaflecken**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Justus Engelhardt

aus Hamburg

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am ..12.Aug.1968.
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer
Correferent: Dr. med. W. Kühnel

Inhalt

	Seite
A. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	5
B. <u>Material</u>	6
C. <u>Methoden und Ergebnisse</u>	
I. Nachweis am Stoffpräparat nach:	
1. ROUSSIN	9
2. PERRANDO	9
3. CORIN und STOCKIS	10
4. DERVIEUX	11
5. ELLERMANN	11
6. JOESTEN	13
7. BAECCHI	14
8. GENNARO	15
9. MACAGGI	16
10. HEKTOEN und RUKSTINAT	18
11. BOLDRINI	19
12. KOCKEL/MUELLER	21
13. DZHALALOV	22
14. GATTI	23
15. SQUILLACI	24
16. BOLLONE	25
II. Nachweis im Fleckenextrakt nach:	
17. UNGAR	27
18. WEDERHAKE	27
19. WINDSOR	28
20. GASIS	29
21. STRASSMANN	30
22. MUELLER	30
23. PELTZER	31
24. BORNAND und BONIFAZI	32

	Seite
25. MARCILLE	33
26. GLAISTER	33
27. DETTLING, SCHÖNBERG und SCHWARZ	34
28. DEROBERT, HADENGUE und LE BRETON	35
29. BOHNE und DIECKMANN	36
30. HALLMANN	37
31. VASTERLING	38
 III. Nachweis nach Zerstörung des Gewebes mit Säure nach POLLAK	 39
 D. <u>Besprechung</u>	
I. Nachweis am Stoffpräparat	
1. Die Färbung	41
2. Die Behandlung des gefärbten Gewebes ...	44
II. Nachweis im Fleckenextrakt	
1. Die Mazeration	47
2. Das Zentrifugieren	48
III. Die besten Methoden zur Anfärbung von Spermien	 50
 E. <u>Zusammenfassung</u>	 51
 F. <u>Tabellen</u>	 52
 G. <u>Literatur</u>	 54

A. Einleitung und Fragestellung

Spermatozoen in einem Spermafleck in ihrer morphologischen Struktur sichtbar zu machen, gilt als sicherster Beweis für das Vorliegen eines Ejakulates. Daher haben die Methoden der Anfärbung der Samenfäden in Spermaflecken eine große Bedeutung. Die Affinität der protoplasmatischen Substanzen für gewisse Farbstoffe ist Grundlage einer großen Zahl von Färbemethoden. In neuester Zeit wurde deren Beweiswert allerdings eingeschränkt durch hochempfindliche und zum Teil spezifische Proben auf nichtmorphologischer Grundlage: die Diagnose von Spermaflecken durch den Nachweis der sauren Phosphatase, die Papierchromatographie und die Verwendung von Anti-Sperma-Serum (vg. KLÜMPEN). Diese Methoden zeigen zum Teil auch dort positive Ergebnisse, wo - wie bei Oligo- und Azoospermie - der Nachweis morphologischer Spermabestandteile fragwürdig oder unmöglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine möglichst vollständige Ermittlung aller in der Literatur angegebenen Methoden zum Thema unter möglichst exakter Quellenangabe versucht. Die anscheinend ergiebigsten und voneinander nicht nur in Nuancen abweichenden Methoden wurden sodann systematisch nachgeprüft. Eine derartige vergleichende Untersuchung ist bisher noch nicht unternommen worden.

B. Material

Die Spermaflecken wurden in Zusammenarbeit mit der Fertilitäts-Sprechstunde der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität Marburg gewonnen ¹⁾. Zur Herstellung der Flecken wurde nur Sperma verwendet, das mehr als 40 Millionen/ml Spermatozoen enthielt. Auf diese Weise wurden Fälle mit Azoospermie nicht untersucht. Oligospermien zwischen 30 und 40 Millionen/ml ergaben in Vorversuchen nur in seltenen Fällen positive Ergebnisse. Besonders Färbungen am Stoff waren durchweg negativ.

Das nach 24 Stunden dünnflüssig gewordene Ejakulat wurde auf Textilgewebe getropft, das über Petrischalen gespannt war. Die Flecken wurden bei Zimmertemperatur getrocknet. Es wurden folgende Stoffarten verwendet: 1. weißes Halbleinen, 2. buntbedruckter Baumwollstoff und 3. dunkelgraue gestrickte Wolle. Alle Gewebe waren vorher gewaschen worden. Die untersuchten Flecken hatten ein Alter von maximal 8 Monaten. Die frischesten Flecken waren 2 Tage alt. Aussehen, Geruch und Größe waren, unabhängig von der Spermienmenge im Ejakulat, bei den Flecken sehr unterschiedlich. Auf weißem Stoff hatten sie fast immer landkartenartige Konturen und waren von grauer, am Rande dunklerer Farbe (v. HOFMANN). Alle Gewebe waren im ganzen Umfang des Fleckens steif, "wie gestärkt" (KRATTER). Auf dunklen Stoffen hilft diese Eigenschaft sehr bei der Suche nach einem Fleck. Der von einigen Autoren angegebene kastanienblütenartige Geruch konnte zwar nie festgestellt werden, doch strömten einige Flecken einen urinösen oder fauligen Geruch aus. Die Flecken wurden nach der Trocknung in Briefumschlägen gelagert. Von 39 Spermaproben wurden 76 Flecken angelegt. Von diesen wurden ungefähr 500 Präparate und Ausstriche mit insgesamt 32 Färbemethoden hergestellt.

Für die Färbung direkt am Stoff wurden 1 cm² große Stoffstückchen aus dem Fleck geschnitten, falls der Autor nicht andere Maße vorschrieb. Zur Färbung eines Mazerates oder Zentri-

¹⁾ Herrn Prof. Dr. Braun-Falco danke ich für die Erlaubnis, dieses Material bearbeiten zu dürfen.

fugates aus einem Spermafleck wurden unterschiedlich große und oft mehrere Stoffstückchen genommen. In Vorversuchen wurde auch geprüft, ob das Zentrum oder die Peripherie eines Spermafleckes reicher an Spermien ist. GASIS und DZHALALOV schreiben ausdrücklich eine Entnahme aus der Fleckperipherie vor. Besonders bei Färbungen direkt am Gewebe erwies sich dies aber als nicht so erfolgreich, wie die Entnahme von Gewebe aus dem Zentrum des Fleckes. Das hat KRATTER schon 1921 angegeben und MUELLER und LEITHOFF haben es in neuerer Zeit experimentell bestätigt. Deshalb wurde bevorzugt Material aus der Mitte des Fleckes entnommen, auch wenn Autoren eine Entnahme vom Fleckenrand vorschlugen. Zum Auffinden der Spermien im Präparat oder Ausstrich wurde die 125fache Vergrößerung benutzt. Zur Untersuchung der Bestandteile eines Samenfadens wie Kopfkappe, Hals, Mittelstück und Schwanz wurde mit 600facher Vergrößerung mikroskopiert.

Bei der Vielzahl der Methoden konnten nicht alle an derselben Spermaprobe oder sogar an demselben Fleck geprüft werden. Dies hätte zweifellos den besten Vergleich der verschiedenen Methoden erlaubt. Doch wurden diejenigen Methoden, die negative oder sehr schlechte Ergebnisse zeigten, an "Kontrollflecken" zusätzlich geprüft. Diese Flecken waren erstens mit sehr spermatozoenreichem Ejakulat hergestellt worden und zweitens durch zuverlässige Methoden als stark positiv erwiesen.

Jede Methode wurde an je einem Flecken auf weißem Halbleinen, buntem Baumwollstoff und gestrickter Wolle geprüft. Diese drei Flecken enthielten meistens Sperma von drei verschiedenen Probanden, um die Möglichkeit zufälliger Ergebnisse einzuschränken. Nach einem Einarbeiten in die jeweilige Methode und Vorversuchen wurden meistens 20 Präparate oder Ausstriche hergestellt.

Als positiv wurde ein Präparat bewertet, wenn ein oder mehrere morphologisch vollständige Spermatozoen zweifelsfrei zu erkennen waren. Mutmaßliche Spermatozoenköpfe ohne Schwanz und

ohne Halsteil wurden als negativ bewertet. Spermatozoen mit verstümmeltem Schwanz oder mit Halsteil und Mittelstück wurden als positiv bewertet.

C. Methoden und Ergebnisse

I. Nachweis am Stoffpräparat

1. ROUSSIN (1867)

Man schneidet aus dem Flecken ein kleines Stückchen aus, bringt einzelne ausgezogene Fäden unmittelbar oder nach Mazeration mit destilliertem Wasser auf Objektträger und zerzupft sie mit Nadeln unter Zusatz eines Tropfens der von ROUSSIN angegebenen Lösung (1 Teil Jod, 4 Teile Jodkalium auf 100 Teile Wasser) (zit. u.a. nach v. HOFMANN).

Bei sofortiger Betrachtung unter dem Mikroskop waren sehr schwach bläulich angefärbte Spermien zu sehen. Schwanz und Vorderteil des Kopfes hatten sich nicht angefärbt. Das Gewebe und die anderen Zellen - Epithelien und Bakterien - färbten sich intensiver als die Spermien. Auf gefärbten Fasern stellten sich die Spermien überhaupt nicht dar.

2. PERRANDO (1905)

Aus den Flecken werden etwa 1 cm lange, bis 5 mm breite Streifen geschnitten, in der Mitte abgebogen und so zusammengelegt, daß sich die beschmutzten Flächen berühren. Mehrere solcher Streifen werden zu einem Päckchen zusammengebunden und in einer ammoniakalischen Farblösung 24-48 Stunden lang gefärbt. Die Farbe wähle man im Kontrast zur Farbe des Stoffes. Es können folgende Mischungen angewandt werden: jeweils 2 g Eosin, Methylenblau oder Toluidinblau mit 100 ml 3%igem Ammoniakwasser. Nach dem Färben folgt ein Auswaschen durch ein etwa 24 Stunden langes Schwimmenlassen der gefärbten Päckchen auf

schwach ammonikalischen Wasser, das mehrfach zu wechseln ist. Die Päckchen werden dann sorgfältig aufgebunden, die Streifen entfaltet und entsprechend dem Knick durchschnitten, so daß man etwa 5 mm im Quadrat messende Zeugfleckchen erhält. Diese werden mit folgender Gummimischung mit der Schichtseite nach unten auf einen Objektträger geklebt:

Gummi arab. pur.	30-40 g
Aqua dest.	100 ml
Saccharum alb.	10-20 g
Albumin	2 g

Nach einem Tage ist der Klebstoff so weit erhärtet, daß die obersten Stoffschichten mit einem scharfen Messer abgetragen werden können. Es folgt dann eine Auflockerung der noch anhaftenden Stoffteilchen durch Zusatz einiger Tropfen ammoniakalischen Wassers und ein Eindecken mit der erwähnten Gummilösung.

Die Präparate wurden genau nach der Vorschrift angefertigt. Gefärbt wurde jedoch nur mit Eosin und mit Toluidinblau und eingebettet mit Eukitt. Die umständliche Untersuchung, die mindestens 72 Stunden dauert, zeigte in keinem Präparat ein positives Ergebnis. Die Stoffe färben sich sehr stark an, weil die Färbezeiten viel zu lang sind. Auf jeden Fall ist es wichtig, die obersten Stoffschichten gründlich abzutragen, damit man das Gewebe im durchfallenden Licht betrachten kann.

3. CORIN und STOCKIS (1908)

Zur Färbung wird eine ammoniakalische Erythrosinlösung verwendet:

Erythrosin	0.5
25%iges wässriges Ammoniak	100.0

Die Farblösung verdirbt leicht durch Entweichen von gasförmigem Ammoniak. Es empfiehlt sich daher die Aufbewahrung in einem durch einen Glasstopfen verschließbaren Gefäß.

Ein aus dem verdächtigen Fleck herausgelöster Faden wird etwa 10-30 Sekunden in der Lösung gefärbt und in einem Tropfen Aqua dest. auf einem Objektträger in Fibrillen zerlegt. Vorsichtiges Abtupfen und neuerlicher Wasserentzug vollenden das Präparat.

Nach dem Zerfasern des gefärbten Fadens in einem Tropfen Wasser ist es besser, das Abtupfen und den neuerlichen Wasserzusatz zu unterlassen. Wir ließen die Fibrillen mit der an ihnen haftenden Farblösung auf dem Objektträger antrocknen und schlossen sie dann unter einem Deckglas in Eukitt ein. Durch den Wasserzusatz und das Absaugen des Wassers mit Fließpapier, wie es CORIN und STOCKIS vorschreiben, werden offensichtlich sehr viele der nur locker am Faden hängenden Spermien fortgespült.

Mit der oben beschriebenen geringen Abweichung von der Originalmethode waren sehr viele positive Präparate zu erhalten. Die Spermien lagen in großer Zahl in unmittelbarer Umgebung der Fibrillen. Sie waren leuchtendrot gefärbt, und auch die Schwänze waren trotz etwas blasserer Tönung gut zu erkennen. Weißer Stoff färbte sich blaßrosa und deutlich heller als die Spermien. Andere zellige Elemente färbten sich ebenfalls nur rosa an. FRAENCKELS Beobachtung, daß sich alles gleichmäßig anfärbt, wenn die Farblösung durch Verdunstung nicht mehr genügend Ammoniak enthält, bestätigte sich in unseren Versuchen. Bei dunklen und flauschigen Stoffen war gründliches Zerfasern und Auspressen der Fäden auf dem Objektträger notwendig, damit die Spermien um die Fibrillen herum angetrocknet zu sehen waren.

4. DERVIEUX (1909)

Der in ammoniakalischer Erythrosinlösung (CORIN und STOCKIS) vorgefärbte Gewebefaden wird in einer verdünnten Methylenblaulösung auf dem Objektträger zerzupft!

Methylenblau	0.05
Aqua dest.	100.00.

Dann wird abgetupft, mit einigen Tropfen Aqua dest. ausgewaschen, nochmals mit Filtrierpapier getrocknet und nach Lufttrocknung in Eukitt eingeschlossen.

Diese Modifikation der Methode von CORIN und STOCKIS gab ebenfalls gute Ergebnisse an allen drei Gewebsarten. Die Spermien waren am Kopfteil violett und an den Schwänzen hellblau gefärbt. Einen Vorteil gegenüber der Methode von CORIN und STOCKIS hat das Nachfärben mit Methylenblau nicht. Die dunkler gefärbten Spermien waren im Gegenteil an dunklen und dichten Geweben schlechter zu erkennen. Doch wurde auch hier das überflüssige Auswaschen und Trocknen mit Filtrierpapier weggelassen.

5. ELLERMANN (1911)

Der mit ammoniakalischer Erythrosinlösung (CORIN und STOCKIS) eine Minute vorgefärbte Faden wird mit Wasser abgespült, sorgfältig getrocknet und in Eisenhämatoxylin zerzupft. Der Einschluss in Eukitt folgt nach Abspülen mit Wasser und Eintrocknen des Präparates.

Bei dieser Kombination der Färbung nach CORIN und STOCKIS mit der WEIGERTschen Eisenhämatoxylinfärbung wurde genau nach der Anweisung vorgegangen. Nur wurden die in Eisenhämatoxylin zerzupften Fäden mit ganz wenig Wasser abgespült, da sich im Verlaufe der Versuche immer mehr herausstellte, daß mit der Farbflüssigkeit, die am Faden hängt oder beim Zerzupfen herausgepreßt wird, auch sehr viele Spermatozoen weggespült werden. Auch diese Methode zeigte einen hohen Prozentsatz positiver Ergebnisse (Tabelle I). Die Köpfe der Spermien waren vorn hellrot und hinten dunkelrot bis schwarz gefärbt. Die Schwänze waren schwarz. An hellen Stoffen ist diese Methode der CORIN und STOCKISschen sogar überlegen, da sich mit ihr bei starker

Vergrößerung auch Einzelheiten der Struktur der Samenfäden gut erkennen ließen.

6. JOESTEN (1911)

Vier bis fünf mm² große Zeugstückchen werden zunächst in einer 10%igen Resorzinlösung 6-24 Stunden lang gebeizt und dann in folgendem Gemisch in einem Reagensglas bei 90°C im Wasserbad eine halbe Stunde gefärbt:

Lösung A:

Hämatoxylin	1.0
Alkohol 96%ig	100.0

Lösung B:

Pikrinsäure cryst.	1.5
Aqua dest.	120.0
Liq.ferri sesquichlorat.	5.0

Lösung C:

Kal. jodat.	8.0
Aqua dest.	100.0

Je 3.5 ml der Lösung A und der Lösung B werden zusammengegossen, und 10 Tropfen der Lösung C hinzugefügt. Nach beendeter Färbung ist das Reagensglas mit Wasser aufzufüllen. Die tiefschwarz erscheinenden Fleckchen werden in folgendem Gemisch etwa 3-4 Minuten lang differenziert, bis sie grau erscheinen:

Kalt gesättigte wässrige Oxalsäurelösung	10.0
Kalt gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	10.0
Acid. tannicum	1.0
Alkohol 96%ig	100.0

Dann folgt ein Auswaschen mit Wasser, Auffaserung einiger Fäden in mehreren Tropfen Wasser oder Glyzerin und Einschluß in Glyzerin oder Glyzeringelatine.

Da vom Autor eine Vorbehandlung der Flecken in 10%iger Resorzinlösung für 6-24 Stunden vorgeschrieben war, wurde jeweils ein Zeugstückchen 6, 9, 12, 15, 20 und 24 Stunden lang gebeizt. Das Gewebe erschien nach der Färbung in dem vom Autor angegebenen Gemisch trotz genauer Einhaltung der Vorschrift nicht schwarz, sondern dunkelbraun getönt. Nach der Differenzierung wurden die Fasern, wie angegeben, glashell.

Von den 18 angefertigten Präparaten waren nur in einem einzigen wenige schwarz gefärbte Spermien zu sehen (Spermiafleck auf weißem Halbleinen mit 98 Millionen/ml Spermien). Daß diese umständliche und langwierige Methode mit ihren schlechten Ergebnissen von MUELLER (1920) als eine der besten Methoden zum Nachweis von Samen am Stoff bezeichnet wurde, ist unverständlich.

7. BAECCHI (1912)

Ein etwa 1 cm² großes Stück des verdächtigen Fleckens wird ausgeschnitten und in einer der folgenden Farblösungen eine halbe bis eine Minute lang gefärbt:

I.	1%ige Säurefuchsinlösung	1 Teil
	1%ige Salzsäure	40 Teile
II.	1%ige Methylblaulösung	1 Teil
	1%ige Salzsäure	40 Teile
III.	1%ige Säurefuchsinlösung	1 Teil
	1%ige Methylblaulösung	1 Teil
	1%ige Salzsäure	40 Teile

Die sauren verdünnten Farblösungen sind nur kurze Zeit, die 1%igen Stammlösungen unbegrenzt haltbar. Man wähle je nach der Farbe des Stoffes die blaue oder rote Farblösung, gegebenenfalls die Kombination (Lösung III). Nach der Färbung wird mit 1%iger Salzsäure gründlich ausgewaschen, dann an der Luft oder in absolutem Alkohol getrocknet, in viel Xylol auf-

gehellet und in Balsam eingebettet. Bei sehr alten Flecken ist eine mehrstündige Vorbehandlung mit 20-30%iger wässriger Ammoniaklösung nötig. Die Ammoniaklösung muß aber vor der Färbung mit Aqua dest. abgespült werden!

Die Stoffstückchen wurden nur kurz und vorsichtig in der 1%igen Salzsäure gewaschen und dann an der Luft und nicht in Alkohol trocknen gelassen. Nach der Aufhellung in Xylol und vor dem Einbetten in Eukitt wurde der Stoff auf dem Objektträger mit Nadeln zerfasert und vorsichtig ausgedrückt. Aus den Flecken auf dem Baumwollstoff und auf der dunklen Wolle wurden nur einzelne Fäden herausgezogen, und diese wurden ebenfalls in der oben beschriebenen Weise behandelt.

An Flecken auf weißen und dünnen Textilien war diese Methode immer positiv. Die besten Ergebnisse wurden mit der Farblösung III erzielt, da sich hier die Spermien am intensivsten färbten, jedoch nicht, wie von SCHWARZACHER angegeben, an den Köpfen rot und blau an den Schwänzen. Vielmehr waren die Spermien in ihrer ganzen Länge von einer mehr oder weniger starken violetten Tönung. Die von BAECCHI angegebene Färbedauer von einer halben bis einer Minute erwies sich als optimal. Weiße Gewebsfasern wurden durch die Farblösung nur blaß angefärbt. Die Spermien lagen um die zerfaserten Fäden in der auf dem Objektträger angetrockneten und vorher ausgepreßten Färbeflüssigkeit.

8. GENNARO (1923)

Der Fleck wird nach mehrstündiger Mazeration in 5%iger Formalinlösung für eine halbe Stunde in gleiche Mengen Alkohol und Pyridin gelegt. Dann wird er in Aqua dest. gewaschen und in 3%iger Silbernitratlösung für 4 Stunden in ein Wasserbad von 50°C getaucht. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. wird der Fleck 2 Stunden in folgende Mischung gelegt:

Aqua dest.	100
Formol	5
Acid pyrogallic.	4
Pyridin	8.

Dann kommt er für 2 Stunden in:

Aqua dest.	100
Hydrochinon	1.6
Natriumsulfit	10.0.

Dann wird der Fleck 30 Minuten in Wasser abgespült und in 15%ige Salzsäure gelegt.

Die Mazeration wurde auf 3 Stunden beschränkt, und die Flecken danach an der Luft getrocknet. Dann wurde genau gemäß der Vorschrift vorgegangen. Für das abschließende Bad der Stoffteilchen in der 15%igen Salzsäure, für das GENNARO keine genaue Zeit angibt, wurden verschiedene Zeiten von 1 bis 20 Minuten gewählt. Nach der Behandlung waren die Stoffteilchen sehr mürbe und brüchig geworden. Sie wurden in kleinere Stückchen von 5x5 mm geschnitten und auf Objektträgern mit Nadeln aufgefaserst. Die Stoffstückchen wurden in Glyzerin-gelatine unter Deckglas eingebettet.

In keinem der 20 angefertigten Präparate wurden Spermien gesehen. Zur Kontrolle wurden Fäden aus den gleichen Flecken nach CORIN und STOCKIS und nach der Methode von BOHNE und DIECKMANN (s.u.) gefärbt. Beide Male gab es eindeutig positive Ergebnisse. Bei dieser über 24 Stunden dauernden Methode müssen die Flecken 12 Stunden in 6 verschiedenen Lösungen liegen und werden mehrere Male mit Aqua dest. abgespült. Durch diese Manipulationen wurden offensichtlich die Spermien herausgelöst.

9. MACAGGI (1925)

In je 100 ml Aqua dest. werden 0.9 g Acid. tannicum und 0.45 g Kristallviolett warm gelöst. Nach dem Erkalten wird

beides gemischt, und 100 ml 3%ige Salzsäure hinzugefügt. Das Ganze wird in einem dunklen Glasgefäß aufbewahrt. Diese Farbmischung kann zu einem Drittel mit Aqua dest. verdünnt werden. Dann wird nach der von MACAGGI angegebenen Methode A der Fleck für 15 Minuten bis 24 Stunden (je nach Alter) in 3%iger wässriger Ammoniaklösung eingeweicht. Hinterher wird von der beschmutzten Seite des Fleckens Substanz abgekratzt und auf einem Objektträger getrocknet. Nach Hitzefixation wird 40-60 Sekunden mit der oben angegebenen Farbmischung gefärbt. Danach wird gewässert, getrocknet, mit Immersionsöl direkt untersucht oder vorher in Kanadabalsam eingeschlossen.

Methode B: Für die Färbung von Flecken im Gewebe selbst empfiehlt sich ebenfalls eine Mazeration von 1 cm² großen Zeugstückchen in 3%igem Ammoniak. Nach kurzem Abwaschen wird 60-90 Sekunden gefärbt. Danach soll gewässert werden und in gleichen Teilen 70%igem Alkohol und Essigsäure bis zu zartem Lila entfärbt werden. Für 2-3 Minuten wird dann in absolutem Alkohol entwässert und lange in Xylol aufgehellt. Zum Schluß wird der Stoff in Eukitt eingeschlossen. Bei Betrachtung unter dem Mikroskop sollen die Spermien blau-violett getönt erscheinen. Diese Methode B soll sich nach MACAGGI besonders gut für alte Flecken eignen. Es soll gelungen sein, mit ihr Spermien in 33 Jahre alten Flecken nachzuweisen (DE BERNARDI).

Die Farbnischung wurde nach Vorschrift hergestellt, jedoch nicht mit Aqua dest. verdünnt. Um Farbniederschläge zu vermeiden, wurde sie gefiltert. Bei der von MACAGGI als A bezeichneten Methode wurden die Flecken für 2 Stunden in 3%igem Ammoniak aufgeweicht. Dann wurden die Stoffstückchen auf Objektträger gebracht und von ihnen mit einem anderen Objektträger oberflächlich Substanz abgekratzt und ausgepreßt. Diese wurde wie ein Ausstrich gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt und nach Lufttrocknung in Hitze fixiert. Dann wurde 60 Sekunden gefärbt und gründlich gewässert. Nachdem die Ausstriche an der Luft getrocknet waren, wurden sie in Eukitt

unter Deckglas eingeschlossen.

Obwohl die Farbmischung gefiltert und die Ausstriche gründlich gewässert waren, zeigten sich unter dem Mikroskop dichte kristalline, blaue Niederschläge. Die Spermatozoen waren am Schwanz von dunkler, violetter Farbe. Der Vorderteil des Kopfes war heller, der hintere Teil dunkler blau gefärbt. Durch das Abkratzen des Fleckes mit einem Objektträger waren viele feine Fasern mit in dem Ausstrichpräparat enthalten. Diese waren intensiver gefärbt - wie auch Epithelien und die Farbniederschläge - als die Spermien.

Bei der Methode B wurde nach zweistündiger Mazeration in der 3%igen Ammoniaklösung genau der angegebenen Anleitung gefolgt. Vor dem Einschluß in Eukitt wurden die Stoffstückchen mit Nadeln zerzupft, um die in den Gewebemaschen und an den Fasern haftenden Spermien besser sichtbar zu machen. Doch wurde in keinem dieser Präparate ein Spermatozoon gesehen. Es waren dieselben Flecken verwendet worden, die bei MACAGGIs Methode A in 50% ein positives Ergebnis geliefert hatten. Als sehr ungünstig erwies sich auch hier, noch mehr als bei der Methode A, daß der Stoff so intensiv dunkelblau mitgefärbt wurde. Hier zeigte sich schon, daß bei derselben Färbung und denselben Flecken die Suche nach gefärbten Spermien direkt im Gewebe dem Ausstrichpräparat unterlegen ist. Denn MACAGGIs Methode A ist ja eigentlich keine Färbung am Stoffpräparat.

10. HEKTOEN und RUKSTINAT (1928)

Das befleckte Stück Stoff wird zuerst für 12-24 Stunden in 1%igem Ammoniakwasser eingeweicht. Darauf werden einzelne herausgezogene Fäden 2 Minuten in 5%iger wässriger Erythrosinlösung gefärbt. Nach schnellem Auswaschen in destilliertem Wasser wird 2 Minuten in 10%iger wässriger Lösung von Eisen-III-chlorid gefärbt. Danach werden die Fäden sofort 2 Minuten

in 2%iger Hämatoxylinlösung (nach WEIGERT) gefärbt. Nach einem Spülen in destilliertem Wasser sollen die Fäden dann in 0,5%-igem wässerigem Eisen-III-chlorid in feinste Fibrillen zerzupft werden. Sie werden aus der Lösung genommen, wenn sie rötlich oder hellbraun sind. Dann wird in destilliertem Wasser gewaschen, in absolutem Alkohol entwässert, in Kreosol aufgehellt, und abschließend klebt man die Fibrillen in Kanadabalsam auf Objektträger. Wenn die Färbung gut ausgeführt wird, sind die Köpfe der Spermatozoen im Bereich der hinteren Zweidrittel dunkelrot bis schwarz und im vorderen Drittel rosa gefärbt. Der Schwanz nimmt eine rötliche bis violette Farbe an. Das Gewebe wird sich mehr oder weniger rosa anfärben.

Von insgesamt 20 Präparaten waren nur zwei positiv, mit wenigen, am Kopf dunkler und am Schwanz heller braungetönten Spermien. Das von den Autoren noch zusätzlich empfohlene Kochen der Stoffteilchen für 1 Minute nach dem Einweichen in Ammoniak, um die Schwänze der Spermien besser zu erhalten, war offensichtlich völlig nutzlos. Hierdurch werden höchstens etwa dem Gewebe anhaftende Spermatozoen herausgespült. Durch keine der bekannten Mazerationen oder Färbungen werden die Schwänze besonders zerstört.

11. BOLDRINI (1938)

Man stellt ein Häutchen von durchsichtigem Celluloid her und läßt dieses für mindestens eine halbe Stunde im warmen Wasser liegen. Dann schneidet man von dem zu untersuchenden Stoff ein quadratisches Stückchen von 5 mm Seitenlänge heraus und bringt es für eine halbe Stunde in die Lösung A:

Aqua dest.	100 ml
Formalin 40%	1 ml
Kupferazetatlösung 5%	2 ml
Rauchende Salpetersäure	0.5 ml

Sodann wird das Stoffstück, ohne gewaschen zu werden, für mindestens 6 Stunden in die Lösung B übertragen:

Aqua dest.	100 ml
Karbol-Fuchsin-Lösung	15 ml
Essigsäure	10 Tropfen.

Nach Waschen in destilliertem Wasser kommt es wieder für eine halbe Stunde in die Lösung A. Sodann Waschen, und, wenn man auch die Schwänze färben will, für 10 Minuten Eintauchen in eine 0.5%ige Methylenblaulösung. Neuerliche Waschung in Wasser und 80%igem Alkohol. Dann wird das Präparat wieder in Wasser gebracht und zwischen zwei der erwähnten Häutchen so gelagert, daß die gelatinierten Oberflächen des Häutchens unmittelbar auf das Präparat zu liegen kommen. Hierauf wird das Ganze zwischen zwei glatte Kartonblätter gelegt und für eine halbe Stunde energisch gepreßt. Im Anschluß daran folgt für eine weitere halbe Stunde ein Bad in 10%igem Formalin, ferner in Wasser und 80%igem Alkohol, bis das Präparat keine Farbe mehr läßt. Entwässert wurde in 90%igem und in absolutem Alkohol. Abschließend wird in Xylol und in Balsam übertragen. Die Köpfe der Samenfäden sollen sich rotviolett und die Schwänze blau färben.

Bei der Herstellung der von BOLDRINI geforderten durchsichtigen Häutchen wurde in folgender Weise vorgegangen: in einem Wasserbad von 80°C ließen wir Gelatine flüssig werden (2 Teile Gelatine auf 1 Teil Wasser) und gossen sie dann auf über Glasplatten straff gespanntes feuchtes Cellophan. Das Cellophan muß von schwerer Qualität sein, da es sich sonst leicht in Falten wirft. Dann wurde das dünn mit Gelatine beschichtete Cellophanhäutchen auf den Glasplatten trocknen gelassen. Das von BOLDRINI vorgeschriebene Celluloid ist viel teurer als das Cellophan und schwerer zu beschaffen. Für die bei der Lösung B genannte Karbol-Fuchsin-Lösung wurde die Karbolfuchsinlösung nach ZIEHL-NEELSEN benutzt (10 ml alkoholischer gesättigter Fuchsinlösung, 4,5 ml verflüssigtes Phenol und 90 ml Aqua dest.). Nach Bearbeitung der Stoff-

Flecken mit den Farblösungen wurde noch 10 Minuten mit der zur Färbung der Schwänze angegebenen 0.5%igen Methylenblaulösung gefärbt.

Nach der Entfärbung wurden die Präparate genau nach der Anleitung hergestellt. Die Anweisung "Einbetten in Balsam" ist etwas unklar. Hier kann nur das Aufbringen des schon in gelatinierte Häutchen eingeschlossenen Präparates auf einen Objektträger und der Einschluß in Kanadabalsam unter Deckglas gemeint sein. Da das Präparat jedoch schon eine beträchtliche Dicke hat, war die Einbettung auf einem Objektträger schwierig. Bei sorgfältiger Ausführung gelangen aber einige gute Präparate mit violett gefärbten Spermien. Jedoch färbten sich bei diesem Verfahren auch die Textilfasern in derselben Tönung; auch durch gründliches Wässern konnte dies nicht vermieden werden.

Die Benutzung der Gelatinehäutchen bei dieser Methode scheint ohne jeden Wert zu sein, sie verhindert sogar bessere Ergebnisse. Zur Kontrolle wurden nämlich 10 nach BOLDRINI gefärbte Stoffteilchen nicht zwischen die gelantinierten Häutchen gebracht, vielmehr sofort auf Objektträgern zerzupft und ausgepreßt und dann in Eukitt eingeschlossen. Auf diese Weise gab es bessere Resultate als bei dem Einschluß zwischen die gelatinierten Häutchen. Denn die Schichtdicke der Präparate war viel geringer, und besonders bei dunklen und dichten Stoffen waren die durch das Zerzupfen und Auspressen um die Fasern gelagerten Spermien besser zu sehen.

12. KOCKEL/MUELLER (1953)

Diese Modifikation der Färbung nach CORIN und STOCKIS wurde MUELLER mündlich von KOCKEL mitgeteilt.

Eine Anzahl Fäden wird aus dem fraglichen Fleck herausgelöst und auf einen Objektträger gebracht. Dieser wird mit reichlich Farblösung (nach CORIN und STOCKIS) bedeckt, die

man dann über der Flamme verdampfen läßt. Das Verdampfen wird unter Zusatz neuer Farblösung einige Male wiederholt. Die trockengewordenen Fäden werden auf einen weiteren Objektträger überführt und unter Deckglas in Aqua dest. mikroskopiert. Farblösung: 0.5 g Erythrosin in 100 ml einer 25%igen wässerigen Ammoniaklösung.

Bei genauer Beachtung der Färbevorschrift konnten auf den Fasern keine morphologisch vollständigen Spermatozoen erkannt werden. Vermutliche Spermienköpfe waren in geringer Anzahl zu sehen. Die Fasern färben sich dunkelrot, so daß sich die Spermien nicht durch elektive Anfärbung von ihrer Umgebung abheben können. Die Beobachtung MUELLERS, daß bei dieser Modifikation der CORIN-STOCKISschen Färbung die Stoffe ungefärbt bleiben, kann nicht bestätigt werden. Versetzte man aber die Rückstände der verdampften Farblösung mit einigen Tropfen Aqua dest., so konnten unter dem Mikroskop zahlreiche Spermatozoen gesehen werden. Dadurch, daß mit Aqua dest. verdünnt worden war, hoben sie sich gut von ihrer Umgebung ab. Durch das Erhitzen hatten sich die Samenfäden offensichtlich vom Stoff gelöst und waren nun reichlich in den Rückständen der verdampften Farblösung enthalten. Oft fehlten ihnen die Schwänze ganz oder teilweise und ihre Köpfe waren alle eigentümlich plump; dieser Befund wurde an Sperma von verschiedenen Männern erhoben.

13. DZHALALOV (1961)

Vom Rand eines befleckten Stückes Stoff wird eine Faser genommen und in 2-3 Tropfen einer Lösung von 0.25%igem Erythrosin in 2%iger Natronlauge getaucht. Die befeuchtete Faser wird dann zwischen zwei Celluloidplättchen gepreßt, die kurz danach wieder auseinandergenommen werden. Auf beiden Plättchen bleibt ein Abdruck, der unmittelbar danach mikro -

skopisch untersucht wird. Da, wo sich der Abdruck des Fadens befindet, können Spermatozoen direkt in großer Menge nachgewiesen werden.

An Stelle der Celluloidplättchen wurden Objektträger aus Glas verwendet. In einem sehr hohen Prozentsatz der Abdrücke ließen sich hellrot gefärbte Spermatozoen nachweisen (Tabelle I). Sobald aber der Abdruck des Fadens trocken war, sah man keine Samenfäden mehr, eine intensive Kristallbildung der verdunstenden Färbeflüssigkeit machte sie unsichtbar. Um von dieser schnellen Methode dennoch Dauerpräparate zu erhalten, wurden die Abdrücke mit Eukitt überschichtet und unter ein Deckglas eingeschlossen. Dasselbe versuchten wir mit Glyzerin-gelatine. Das Ergebnis war unbefriedigend, da die Abdrücke aufgelöst, und die Spermien in der Verdünnung mit Eukitt oder Glyzerin-gelatine nicht mehr zu sehen waren. Das Auflegen eines Deckglases direkt auf den Abdruck und anschließendes Abdichten mit Paraffin gab noch die besten Ergebnisse. Der besondere Wert dieser Methode liegt in dem schnellen Nachweis intensiv mit Sperma befleckter Stellen. Farbe und Art des Materials des Stoffes spielen keine Rolle.

14. GATTI (1963)

In Abwandlung bereits bekannter Methoden geht GATTI so vor: Erforderlich sind 2 Lösungen, Lösung A wird in einer dunklen Flasche aufbewahrt:

Malachitgrün	0.75 g
Fuchsin S	0.05 g
Aqua dest.	125 ml
Alkohol 95%	25 ml

Unmittelbar vor der Untersuchung wird Lösung B hergestellt:

Aqua dest.	5 ml
Fuchsin S	0.1 g

Der fragliche Stoff wird zuerst 20 Sekunden in die Lösung B getaucht. Danach folgt eine Entfärbung in 70%igem Alkohol für

1-2 Minuten. Getrocknet wird zwischen Löschpapier. Im Anschluß wird eine Färbung in einigen ml der Lösung A für 5-6 Minuten vorgenommen. Es folgt eine Entfärbung in 90%igem Alkohol (etwa 20 Sekunden) und ein weiterer Entfärbungsvorgang für 45-60 Sekunden in absolutem Alkohol. Abschließend wird alles für 5-10 Minuten in Xylol verbracht. Einbettung in Kanadabalsam beendet die Aufarbeitung.

Nach Herstellung der Lösungen und Färbung wurden die Stoffteilchen auf dem Objektträger zerzupft und ausgepreßt. Dennoch erwies sich diese Methode für dunkle und flauschige Stoffe als ungeeignet, weil die Spermatozoen zu schwach angefärbt wurden. Die äußeren Umrisse waren von zartem Rosa, das Protoplasma war hellgrün gefärbt. Von dunklen Textilfasern heben sich die Spermien also gar nicht ab. Helle Stoffe werden nur schwach gefärbt, und so stellten sich die Samenfäden nach genügend langem Aufhellen in Xylol auf dem Stoff gut dar.

15. SQUILLACI (1964)

Ein kleines Stück des Stoffes oder nur ein Faden wird mindestens 30 Minuten in eine Lösung nach PAPPENHEIM-UNNA eingetaucht. Danach kommt ein schnelles Spülen des Stoffes in 70%igem Alkohol und, wenn nötig, wird sehr sehr schnell in absolutem Alkohol differenziert. Sonst genügt es, gut an der Luft trocknen zu lassen. Dann werden die Textilfäden in einem Tropfen Xylol eingehüllt, damit sie auf dem Objektträger bei der Untersuchung nicht zerstreut werden. Abschließend wird in Kanadabalsam eingebettet.

Mit der Methylgrün-Pironin-Lösung nach PAPPENHEIM-UNNA (0.1 g Methylgrün, 0.9 g Pironin, 9 ml absoluter Alkohol, 10 ml Glyzerin, 100 ml 0.5%iges Phenolwasser) färbten sich die Spermien grün an, das Gewebe schwach rötlich. Auch bei dunklem Baumwollstoff konnten nach Aufhellen mit Xylol die Samenfäden gut erkannt werden. Allerdings wurden auch andere zellige Elemente

grün angefärbt. Nach Angaben des Autors geschieht dies nur, wenn zu lange in Alkohol oder Wasser differenziert wird. Bei genauem Einhalten seiner Färbevorschriften werden dennoch alle Epithelien und Bakterien gleich grün angefärbt wie die Spermatozoen. Bei der typischen Gestalt der Spermatozoen ist dies jedoch nur ein geringer Nachteil.

16. BOLLONE (1967)

Der Autor benutzt den hohen Gehalt der Spermienköpfe an Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu einem Nachweis von Sperma mit der FEULGEN-Reaktion. Läßt man nach salzsaurer Hydrolyse fuchsin-schweflige Säure (FEULGENs Reagens oder SCHIFFsche Base) auf DNS einwirken, so entsteht eine rotviolette Verbindung als Zeichen eines positiven Ausfalls der Reaktion.

Es werden aus den Flecken kleine Stückchen von der Größe 5x10 mm geschnitten. Zuerst kommt eine Hydrolyse in 1 n Salzsäure für 20 Minuten bei 60°C. Nach Auswaschen in Wasser kommt die Färbung von 30 Minuten in SCHIFFscher Base. Danach wird eine Minute lang in folgender Lösung gefärbt:

Aqua dest.	200 ml
NaHSO ₄ 10%ig	20 ml
HCl 1 n	10 ml
Methylblau 1%ig	1 ml.

Jetzt wird für 3 Minuten entfärbt. Dann werden die Stoffstückchen in 70%igen Alkohol mit einigen Tropfen HCl gebracht, entwässert und in Eukitt eingeschlossen.

Gefärbte Stoffe wurden durch dieses Vorgehen fast völlig entfärbt. Die Köpfe der Spermien waren rotviolett gefärbt, die Schwänze und Verbindungsstücke schwach bläulich. Die Hälfte aller Präparate war jedoch negativ. Vielleicht lag das daran, daß nur sehr frische Flecken ein positives Ergebnis zeigen sollen. Nach BOLLONE liegt das Höchstalter der Flecke mit positivem Ergebnis bei 3 Monaten. In unseren Versuchen waren jedoch auch schon Präparate negativ, die von Flecken stammten,

welche wenig älter waren als 1 Monat. Der Wert dieser Methode liegt zweifellos darin, daß auf Grund der elektiven Anfärbung der DNS in den Köpfen eine Verwechslung mit Fremdkörpern und anderen zelligen Elementen schwerer ist. Die Blaufärbung der Schwänze ist in der Tat nur sehr schwach, und oft wurde man nur durch die roten Köpfe auf ein Spermatozoon aufmerksam. Das vom Autor beschriebene Zusammenliegen der Spermien mit den Köpfen zu kleinen "Nestern" konnte in keinem Fall beobachtet werden.

II. Nachweis im Fleckenextrakt

17. UNGAR (1887)

UNGAR verwendete als einer der ersten die von Robert Koch eingeführten Deckglas- und Trockenpräparate. Zur Färbung von Spermien empfahl er eine saure Methylgrünlösung:

Aqua dest.	100 ml
Methylgrün	0.3 g
Salzsäure 1 n	6 Tropfen

Als Färbedauer werden eine bis drei Stunden empfohlen.

Je 1 cm² große Stoffstückchen aus der Mitte eines Spermafleckes wurden für 6 Stunden in Reagensgläsern mit destilliertem Wasser mazeriert. Der Überstand wurde abpipettiert, und von dem Sediment ein Ausstrich auf einem Objektträger hergestellt. Nach vorsichtiger Warmlufttrocknung und Hitzefixation wurde der Ausstrich für 3 Stunden mit der von UNGAR angegebenen Farblösung überschichtet. Hinterher wurde nach Abspülen an der Luft getrocknet.

Etwa die Hälfte aller Ausstriche waren positiv, mit zart angefärbten Spermatozoen. Der Kopf war hinten dunkelgrün und vorn durchsichtig hellgrün getönt, die Schwänze waren fast farblos. Bei Ausstrichen der Mazerate von Flecken auf Wolle waren besonders viele winzige Fibrillen vorhanden und ebenfalls gefärbt.

18. WEDERHAKE (1905)

Der auf Sperma verdächtige Fleck wird mit physiologischer Kochsalzlösung, die nicht zu spärlich zu bemessen ist, abgelöst. Das Gelöste wird mittels einer Zentrifuge oder auch im Spitzglas sedimentiert. Dann gießt man die über dem Sediment stehende Flüssigkeit bis auf 1 ml ab, setzt einen Tropfen Jod-

tinktur zu, schüttelt gut durch, fügt 1 ml einer Krozeinscharlachlösung hinzu und schüttelt abermals. Jetzt wird mit Wasser nachgefüllt, bis das Zentrifugenröhrchen fast voll ist. Man zentrifugiert von neuem, pipettiert auf einen Objektträger und bedeckt mit einem Deckgläschen. Will man das Präparat konservieren, so mischt man das Sediment mit einem Tropfen Glyzerin und bedeckt erst jetzt mit einem Deckgläschen.

Krozeinscharlachlösung: den Farbstoff in 70%igem Alkohol lösen, bis ein Teil des Pulvers ungelöst bleibt. Diese konzentrierte Lösung wird gefiltert. Die Köpfe der Spermatozoen sind intensiv rot gefärbt.

Die Stoffteilchen wurden in Uhrglasschälchen 12-24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung eingeweicht und dann mit einem Glasstab ausgedrückt. Diese molkige Flüssigkeit wurde 5 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert. Mit dem Sediment wurde weiter verfahren, wie oben beschrieben.

Die Samenfäden erschienen in blassem Rot. Die beim Zentrifugieren angereicherten Fremdkörper und zelligen Elemente waren dunkler und intensiver gefärbt als die Spermien. Nach Zusatz von Glyzerin hielten sich die Ausstriche mehrere Monate, doch müssen sie vor Staub sorgfältig geschützt werden.

19. WINDSOR (1908)

Fixieren der Spermien im Fleck mit MÜLLERScher Flüssigkeit (2.5 g Kaliumbichromat, 1 g Natriumsulfat, 100 ml Aqua dest.). Dann den Stoff auspressen und die trübe spermatozoenhaltige Flüssigkeit direkt auf einen Objektträger tropfen lassen. Jetzt die Flüssigkeit mit 1 oder 2 Tropfen einer 1%igen wässerigen Eosinlösung versetzen.

Nach längerem Suchen konnte man vereinzelte, rosa angefarbte Spermatozoen in der Flüssigkeit sehen. Sie waren etwas intensiver als die anderen in der Flüssigkeit schwimmenden Korpuskeln gefärbt. Offensichtlich waren die Spermien in zu

großer Verdünnung auf dem Objektträger. Dies kam wohl erstens daher, daß besonders die dickeren Stoffe bei der Fixation in MÜLLERScher Flüssigkeit sehr viel Flüssigkeit aufsaugen, die beim Auspressen der Flecken das eingetrocknete Ejakulat verdünnt. Zweitens lösten sich durch das Auspressen wohl nicht alle Spermien aus dem Textilgewebe. Außerdem erschwerte die mehr oder weniger schleimige Spermaflüssigkeit das Betrachten der Spermien. Aus ihr bilden sich beim Verdunsten der Flüssigkeit auf dem Objektträger zusammen mit manchen Fixations- und Mazerationsflüssigkeiten Kristalle, die dann die Spermien verdecken.

20. GASIS (1910)

Hier wird ebenfalls eine Färbung mit Eosin empfohlen. Aus der Peripherie des Fleckens werden kleine Stückchen geschnitten und in einer 1%igen Sublimatlösung mit einigen Tropfen Salzsäure 5 Minuten oder länger mazeriert. Das Mazerat wird dann nach Trocknen über der Flamme mit Eosin gefärbt und in einer 1%igen Jodkalilösung differenziert. Es sollen dann nur die Samenfäden gefärbt sein.

Das mit Sperma befleckte Gewebe wurde für 30 Minuten in Zentrifugenröhrchen mit Sublimatlösung gebracht. Danach wurde 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Dieses Zentrifugat wurde nach Hitzeexfixation mit einer 1%igen wässrigen Eosinlösung 4 Minuten gefärbt. Dann wurde mit Wasser abgespült und kurz mit der 1%igen Jodkalilösung differenziert. Nach Überführen in 96%igen Alkohol für 3 Minuten wurde an der Luft trocknen gelassen.

Wenn gemäß der Angabe von GASIS nur Gewebe aus der Peripherie eines Fleckes entnommen wurde, waren deutlich weniger Spermien zu sehen, als wenn Material aus der Mitte verwendet worden war. Dennoch waren in über der Hälfte der Fälle die Präparate negativ.

21. STRASSMANN (1921)

Es wird eine Kombination der GRAMschen Bakterienfärbung mit der Färbung nach BAECCHI empfohlen. Das Präparat wird kurz mit 1%igem Methylblau oder 1%iger Säurefuchsinlösung gefärbt, in 1%iger Salzsäure abgespült und schnell gewässert. Dann wird 2 Minuten mit frischem Anilinwasser-Gentianaviolett gefärbt und 1 Minute in LUGOLscher Lösung entfärbt. Nach gründlichem Abspülen in Alkohol wird mit Xylol behandelt und in Kanadabalsam eingebettet. Bei dieser Färbung treten die hinteren Teile der Köpfe dunkelblau-violett hervor, während der vordere Abschnitt der Köpfe und die Schwänze sich blau oder rosa färben.

Eingeweicht wurde in destilliertem Wasser mit einem geringen Zusatz von 1%iger Sublimatlösung. Nach 24 Stunden wurde zentrifugiert, und Ausstriche wurden angefertigt, die in der beschriebenen Weise gefärbt wurden. Trotz des Zusatzes von Sublimat waren in allen Ausstrichen große Mengen von Bakterien zu sehen. Diese und andere zellige Elemente färbten sich ebenfalls stark an und erschwerten so die Erkennung der Spermien. Bei der Gegenfärbung nach BAECCHI erwies sich die Säurefuchsinfärbung als besser als die Methylblaufärbung. Hierbei färbten sich der Vorderteil des Kopfes und der Schwanz rötlich.

22. MUELLER (1926)

Für die von MUELLER empfohlene Färbung nach MAY-GRÜNWALD wurde zur Herstellung der Ausstriche eine eigene Modifikation der von DEROBERT et. al. und von BOHNE und DIECKMANN beschriebenen Methoden zur Herauslösung der Spermien aus dem Stoff verwendet.

Zentrifugengläser wurden mit je 2 ml Aqua dest. gefüllt. An einem Zinkdraht wurden quadratische Stoffstückchen von 0.5 cm

Seitenlänge so befestigt, daß sie in das destillierte Wasser eintauchen. Darauf wurden die Gläser oben mit Watte verschlossen und für 24 Stunden in einen Brutschrank mit 37°C gestellt. Am nächsten Tage wurde 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Drahtes mit den Stoffteilchen wurde nochmals kurz zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Sediment auf einen Objektträger getropft. Ein Ausstrich wurde angefertigt und an der Luft getrocknet. Auf den unfixierten lufttrockenen Ausstrich wurde Farblösung nach MAY-GRÜNWALD aufgegossen, nach 3 Minuten mit einer Pipette die gleiche Menge neutralisiertes destilliertes Wasser zugefügt und mit der Farblösung durch Bewegen des Objektträgers oder Aufziehen mit der Pipette vorsichtig gemischt. Mit dieser verdünnten Lösung wurde weitere 5-10 Minuten gefärbt und dann so lange mit neutralisiertem destilliertem Wasser abgespült, bis der Ausstrich einen blaß rosaroten Farbton angenommen hatte. Zum Schluß wurde an der Luft getrocknet.

Die Färbung gelang am besten mit ganz frischen Ausstrichen. Die Spermatozoen färbten sich elektiv hellrot an und hoben sich sehr gut von den schwachblau angefärbten anderen Korpuskeln und Bakterien ab. Sogar morphologische Einzelheiten der Spermatozoen konnten mit dieser Färbung gut ausgemacht werden. Diese Färbung ist der von STRASSMANN angegebenen allein schon deshalb überlegen, weil sie schneller und weniger kompliziert ist.

23. PELTZER (1935)

Die Flecken werden mit 3%igem Wasserstoffsuperoxyd betupft. Der Schaum wird entfernt. Die betupfte Stelle wird dann mit einer Pinzette ausgepreßt und der austretende Schaum wird mit einer Platinöse abgekratzt. Durch dessen Ausstreichen auf Objektträger gewinnt man mehrere Präparate, die mit 2%iger

Diese Methode ist zur Herstellung von Dauerpräparaten nicht geeignet, da nach Antrocknen des Mazerates die Spermien nicht mehr sichtbar waren. In frischem Zustand stellten sie sich jedoch leuchtendrot dar. Ausgepreßter Schmutz und Gewebs-
teile wurden aber ebenfalls stark mitgefärbt. So kann das Finden von Spermien im Ausstrich Schwierigkeiten machen, zumal wenn sie nicht sehr zahlreich vorhanden sind. Diese sehr schnelle und ohne langes Einweichen arbeitende Methode war immerhin in der Hälfte aller Präparate positiv (Tabelle I).

24. BORNAND und BONIFAZI (1935)

Man mazeriert mehrere bis 24 Stunden bei 37°C und mit wenig physiologischer Kochsalzlösung. Dann preßt man mit einer Pinzette aus und zentrifugiert mit geringer Geschwindigkeit. Der Rückstand wird ausgestrichen, bei 37°C getrocknet und nach GRAM gefärbt. Man erhält eine Doppelfärbung: der Halsteil ist violett, alle übrigen Teile des Samenfadens sind rosa gefärbt.

Es wurden hier verschiedene Stoffteilchen des gleichen Spermafleckens unterschiedlich lange mazeriert (6, 12, 18 und 24 Stunden). Im Endergebnis konnte bezüglich der Menge der im Ausstrich vorhandenen Spermien kein Unterschied festgestellt werden. Allerdings hatten die Flecken ja auch ein nur geringes Alter.

Eine Doppelfärbung konnte nicht beobachtet werden. Die Spermien waren hellviolett getönt und nur an ihrer typischen Gestalt zu erkennen. Gefärbt waren sie wie alle anderen Zellen und Bakterien. So kann man hier eigentlich nicht von einer Spermatozoenfärbung sprechen. Bei Vergleich dieser Färbung mit der Kombination von GRAM und BAECCHI (STRASSMANN) erkennt man, daß die Kombinationsfärbung wenig Sinn hat, wenn eine Färbung der Kombination - nämlich GRAM - schlechte Ergebnisse liefert. Da der gute Effekt der Kombinationsfärbung durch die Farbblösung von BAECCHI bewirkt wird, ist die Färbung nach GRAM

auch in der Kombination überflüssig.

25. MARCILLE (1935)

Man mazeriert das Gewebe für einige Stunden mit Ammoniakwasser, das mit einigen Tropfen 1%iger Erythrosinlösung versetzt ist, preßt zwischen den Fingern aus und wäscht das Gewebe einige Male mit Wasser aus. Die vereinigten Flüssigkeiten werden zentrifugiert, und der Niederschlag wird unter dem Mikroskop geprüft.

Ein Uhrglasschälchen mit 1 n Ammoniaklösung wurde mit 5 Tropfen einer 1%igen Erythrosinlösung versetzt, und die befleckten Stoffteilchen wurden 3 Stunden mazeriert. Nach Zentrifugieren (5 Minuten bei 3000 U/min) und Abpipettieren des Überstandes wurde das gefärbte Sediment auf einen Objektträger unter Deckglas gebracht.

Die Spermien färbten sich mit diesem seit CORIN und STOCKIS bewährten Farbstoff hellrot an. 9 von 16 Ausstrichen waren positiv. Daß diese Quote nicht höher lag, kann man sicher auch damit erklären, daß ein Auspressen mit den Fingern für das Herauslösen der Spermien offensichtlich nicht genügt. Auch scheint die von CORIN und STOCKIS verwandte konzentrierte Ammoniaklösung die Spermien besser aus ihrer Verklebung mit dem Gewebe zu lösen, als die hier benutzte 1 n Ammoniaklösung in Wasser.

26. GLAISTER (1945)

Zuerst werden kleine Stoffteilchen aus dem befleckten Gewebe ausgeschnitten und in Uhrglasschälchen mit destilliertem Wasser und 0.3% Essigsäure aufgeweicht. Nach 10 Minuten werden mit den feuchten Stoffteilchen mittels einer kleinen Pinzette Ausstriche auf Objektträger gemacht. Darauf folgt ein Fixieren

in Hitze und mit Methylalkohol. Nach Behandlung in absteigendem Alkohol und schnellem Spülen in Wasser kommt eine Färbung mit Hämalaun (20 Minuten). Hernach wird der Ausstrich für eine halbe Stunde in fließendem Wasser gespült und mit 3%iger alkoholischer Eosinlösung für 3 Minuten gegengefärbt. Vor dem Eindecken in Kanadabalsam kommt noch eine Differenzierung in 70%igem, 90%igem und absolutem Alkohol.

In weniger als der Hälfte der Präparate konnten Spermatozoen entdeckt werden. Sicher lag das nicht an der Färbung mit Hämalaun und Eosin (Spermien werden gut sichtbar violett gefärbt), sondern an der Methode, mit der die Ausstriche gemacht werden sollen: bei bloßem Bestreichen der Objektträger mit den feuchten Flecken gehen sicher nur sehr wenige Spermien auf das Glas über.

26. DETLING et al. (1951)

Es wurde nach Aufweichen des Spermafleckes ein Ausstrich von dem Zentrifugat der ausgepressten Flüssigkeit hergestellt. Nach Lufttrocknung und Fixation mit Hitze und Methylalkohol wurde in absteigendem Alkohol behandelt. Darauf wurde mit Wasser gespült und eine halbe Stunde in Hämalaun gefärbt. Nach Spülen folgte ein kurzes Nachfärben in 3%iger wässriger Eosinlösung, ein weiteres Spülen und die abschließende Lufttrocknung.

Mit dieser bei DETLING et al. beschriebenen, mit GLAISTERS Methode fast identischen Hämalaun-Eosinfärbung wurden sehr gute Ergebnisse erzielt. In 80% der Ausstriche wurden dunkelviolett gefärbte Spermatozoen gesehen. Der oben beschriebene Untersuchungsgang ist der Methode von GLAISTER wohl überlegen, weil die aus dem Flecken gepresste Flüssigkeit vor dem Ausstreichen auf dem Objektträger zentrifugiert wird. Hierbei werden die Spermien im Sediment angereichert. Doch muß bei jedem Zentrifugieren auch eine Anreicherung anderer korpuskulärer

Elemente wie Bakterien, Epithelien und Gewebsfibrillen in Kauf genommen werden. Deswegen ist es wichtig, daß sich Spermien anders anfärben als die Fremdkörper, und daß der Untersucher ein sicheres Auge für die typische Gestalt und Größe (und deren Abweichungen) des Spermiums besitzt.

28. DEROBERT, HADENGUE und LE BRETON (1950)

Eine Stofffläche von einigen cm^2 wird in ihrer Mitte an einem sechs cm langen Messingdraht aufgespießt. Eine Verschlingung im Mittelteil des Drahtes fixiert das Gewebe in einer Schlinge, deren beide freie Enden nahe aneinander kommen. Diese Anlage wird derart in ein Zentrifugenröhrchen eingeführt, daß das zusammengehaltene Gewebe vom Boden der Röhre entfernt bleibt. Eine sterile Kochsalzlösung (0.7%) wird ins Röhrchen gefiltert. 24 Stunden einweichen. Dann zentrifugieren und dem Zentrifugat nach Absaugen des Überstandes zwei Tropfen einer ammoniakalischen Erythrosinlösung hinzufügen. (Diese Methode zum Herstellen eines Zentrifugates hatten wir mit geringen Abwandlungen schon für die Färbung nach MAY-GRÜNWALD benutzt.)

Von den 20 angefertigten Ausstrichen waren 17 positiv. Man sah guterhaltene, leuchtend rot gefärbte Spermien. Die ammoniakalische Erythrosinlösung (CORIN und STOCKIS) erwies sich auch hier wieder als besonders geeignet zur Anfärbung von Spermatozoen. Sie wurde neben das auf den Objektträger pipettierte Zentrifugat getropft und dann mit diesem vermischt. Durch Auflegen eines Deckgläschens und Abdichten mit Paraffin - nach der Trocknung des Ausstriches - erhielten wir sehr schöne Dauerpräparate. Bei den hier verwendeten relativ frischen Flecken reichte eine Einweichdauer von 8 Stunden aus.

29. BOHNE und DIECKMANN (1956)

Den ausgeschnittenen Flecken mit der befleckten Seite nach unten etwa 5 bis 8 mm über dem Boden des Zentrifugenglases an einem Haken aus V₂A-Stahl aufhängen. Nach Füllen des Röhrchens mit 1.5 ml Fermentlösung mit Wattebausch verschließen.

Die Fermentlösung besteht aus:

Pankreatin absolut.	0.001
Glyzerin	
Salzlösung aa ad	10.0

Diese 0.01%ige Pankreatinlösung wird derart hergestellt, daß das Pankreatin stets in gleichen Teilen Glyzerin und Salzlösung gelöst wird. Die Salzlösung besteht aus:

-- NaCl	0.9
Na ₂ CO ₃	0.25
Aqua dest. ad	100.0

Die Einweichdauer des befleckten Gewebes beträgt 24 Stunden in einem Brutschrank mit 37°C. Dann 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren und den Drahhaken mit dem Textilstück entfernen. Nach Abpipettieren des Überstandes wird das Sediment mit einem Tropfen der Farblösung nach BAECCHI versetzt und gut durchgeschüttelt. Dann auf einem Objektträger mikroskopieren.

Statt eines Hakens aus V₂A-Stahl wurde der billigere Messingdraht verwandt. Oft war es sehr gut, nach Entfernen des Drahtes mit dem Stoff nochmals zu zentrifugieren, um etwa hochgewirbelte Spermien wieder zu sedimentieren. Die von BOHNE und DIECKMANN ermittelte optimale Einweichdauer von 24 Stunden konnte bei unseren Versuchen auf 12 Stunden reduziert werden, ohne daß das Ergebnis schlechter wurde.

Diese neuartige, auf der proteolytischen und diastatischen Wirksamkeit standartisierten Pankreatins beruhende Methode, die Spermien aus ihrer Verkittung mit den Textilfasern zu lösen, ergibt zusammen mit der bewährten Anfärbung der Spermien

nach BAECCHI einen optimalen Nachweis von Sperma auf Textilgewebe. 20 von 22 Präparaten waren positiv mit rotviolett gefärbten und morphologisch vollständigen Spermatozoen. Die Färbung der Ausstriche mit ammoniakalischen Erythrosin nach CORIN und STOCKIS gab ähnlich gute Ergebnisse. Denn die guten Resultate beruhen vor allem auf der spermienlösenden Wirkung des Pankreatin-Salzgemisches und deren Anreicherung durch das Zentrifugieren.

Allerdings eignete sich diese Methode nicht sehr gut für das Herstellen von Dauerpräparaten, da das Zentrifugat durch den Gehalt an Glyzerin nicht trocknet. Auch Versuche, Ausstriche mit Hitze zu fixieren, mißlangen. Bei sorgfältiger Lagerung ließen sich jedoch noch monatelang Spermatozoen auf dem Objektträger nachweisen. Zum Schutz vor Staub bedecke man den Objektträger mit einem Deckglas.

Unter Verwendung der von DEROBERT et al. angegebenen Mazerationsmethode wurden ferner die von HALLMANN empfohlene Färbung mit Azur-Eosin und die von VASTERLING erwähnte Anfärbung eines Ausstriches von Spermien nach PAPANICOLAOU erprobt:

30. HALLMANN (1939)

Nach Lufttrocknung des auf einen Objektträger ausgestrichenen Zentrifugates wurden die Präparate 3-5 Minuten in Methylalkohol fixiert. Dann wurde mit frisch verdünnter Azur-Eosinlösung nach GIEMSA-ROMANOWSKI (10 Tropfen auf 5 ml Aqua dest.) 20 Minuten gefärbt, mit destilliertem Wasser nachgespült und in Kanadabalsam eingebettet.

Hinsichtlich der Häufigkeit der nachgewiesenen Spermien unterschied sich diese Färbung selbstverständlich nicht wesentlich von der von DEROBERT, HADENGUE und LE BRETON veröffentlichten Originalmethode. Doch färbten sich die Spermatozoen mit der GIEMSA-Farblösung bei weitem nicht so intensiv

und elektiv, wie mit der ammoniakalischen Erythrosinlösung.

31. VASTERLING (1960)

Sofort nachdem die Ausstriche leicht angetrocknet sind, wird durch Einlegen in ein Gemisch von 95%igem Alkohol und Äther zu gleichen Teilen für mindestens 10-15 Minuten fixiert. Dann werden die Ausstriche durch die absteigende Alkoholreihe geführt (80-, 70-, 50%iger Alkohol und destilliertes Wasser). Daran schließt sich eine Färbung in Hämatoxylinlösung an (2 min). Dann ein Abspülen mit destilliertem Wasser, solange Farbwolken abgehen, und Bläuen der Ausstriche in einer Lösung aus 3 ml Ammoniaklösung und 97 ml 70%igem Alkohol. Dann folgt die aufsteigende Alkoholreihe (50-, 70-, 95%iger Alkohol) und eine Färbung für 2 Minuten in Orange-G-Lösung (Merck). Weiterhin Abspülen der überschüssigen Farbstoffes mit 95%igem Alkohol und ein Färben in der Polychromlösung EA 31 (Merck) für 2 Minuten. Nach kurzem Abspülen in 95%igem Alkohol werden die Ausstriche abschließend in Xylol gebracht und in Kanadabalsam eingedeckt.

Diese für die Zytodiagnostik geschaffene Färbung färbte leider die Bakterien und andere Zellen sehr stark mit an. Die Spermien nahmen in unseren Versuchen die Farbe nicht sehr gut an, so daß diese schwierige umständliche Methode anderen und einfacheren unterlegen war. (Auch hier war zuvor das Zentrifugat und der Ausstrich mit der Mazerationmethode nach DEROBERT et al. behandelt worden.)

III. Nachweis nach Zerstörung des Gewebes durch Säure nach POLLAK

Zum morphologischen Nachweis von Spermatozoen in Spermaflecken bevorzugen die meisten Autoren die Anfärbung. Es gibt jedoch einige Methoden des morphologischen Spermanachweises, die nicht auf dem Prinzip der Anfärbbarkeit des Protoplasmas durch organische Farbstoffe beruhen. Die große Widerstandsfähigkeit der Spermien gegenüber Säure und anderen Chemikalien beschrieb GRIGORJEW schon 1902 und gab bereits eine ähnliche Versuchsanordnung wie POLLAK (1943) an. Auch MARIQUE empfahl 1910 eine Untersuchung, die ein Schwefelsäure-Wasser-Gemisch zur Auflösung von Textilgewebe benutzt. Von diesen Verfahren wurde die Möglichkeit des Spermanachweises nach chemischer Zerstörung des Textilgewebes nach POLLAK erprobt und das Resultat mit den Ergebnissen der Färbemethoden verglichen.

Ein etwa 1 cm² großes Stück aus dem Spermafleck wird in ein kleines Becherglas mit konzentrierter Schwefelsäure gebracht und in einen Brutschrank mit 50°C gestellt. Der Stoff beginnt sich sofort bräunlich zu verfärben, bis er schließlich mit zunehmender Zersetzung des Gewebes fast schwarz wird. Wenn nur noch hauchzarte Reste übrig sind, werden diese mit einer Platinöse abgefischt, auf einen Objektträger gebracht und unter Deckglas mikroskopiert. Die Geschwindigkeit, mit der das Gewebe zersetzt wird, hängt natürlich von dessen Material ab. Der Grad der Auflösung des Stoffes muß ständig kontrolliert werden. Meistens wurden die Reste nach 40-60 Minuten abgefischt. Nur die dickere Wolle mußte längere Zeit in der Säure verbleiben und war manchmal selbst nach mehreren Stunden noch nicht genügend zerstört. In 7 von 20 Präparaten wurden schwarz-braune Spermien gesehen. In keinem Fall schienen sie morphologisch vollständig zu sein. Die Köpfe hoben sich sehr schlecht von den ebenfalls schwarz bis bräunlichen Gewebsresten ab.

Auch eine Färbung des Rückstandes mit Eosin, wie sie PHILIPPI bei der ganz ähnlichen Probe nach MARIQUE vorschlägt, erwies sich als untauglich. Die dunkel getönten Spermatozoen nehmen kaum noch Farbe an.

v. GÜTLINGEN und PROKOP halten den Spermanachweis mit Zerstörung des Stoffes durch Säure den Färbemethoden für ebenbürtig, und PHILIPPI berichtet sogar von einem Fall, wo bei einem Flecken alle Nachweismethoden außer derjenigen von POLLAK negativ waren. Bei den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen zeigte sich aber POLLAKs Versuchsanordnung den optimalen Färbemethoden eindeutig unterlegen. Dennoch ist das Schwefelsäureverfahren in der Hand des Erfahrenen sehr brauchbar, obwohl sich selten intakte Spermien darstellen lassen.

D. Besprechung

I. Nachweis am Stoffpräparat

1. Die Färbung

Bei der Anfärbung von Spermatozoen direkt am Stoff stellen sich mehrere Fragen. An erster Stelle gilt es zu verhüten, daß sich die Textilfasern, an denen die Spermien nach Antrocknung haften, zu intensiv oder gar noch stärker anfärben als die Spermien. Durch Aufhellen des Stoffpräparates nach der Färbung in Xylol oder mit Entfärben in Alkohol konnte manchmal erreicht werden, daß sich die Spermien vom Stoff abhoben. Doch zeigten unsere Nachuntersuchungen - wie auch die Untersuchungen anderer Autoren (MUELLER, SCHWARZACHER, DE BERNARDI) -, daß nur die Methoden gute Ergebnisse lieferten, deren Farben eine besondere und elektive Affinität zu den Spermien hatten. Dies ist besonders wichtig für die Färbung am Stoff, weil sich die Spermien ja gut von ihrer Umgebung abheben müssen. Tatsächlich war es manchmal schwierig festzustellen, ob es sich um einen Samenfaden oder ein Kunstprodukt handelte. Diese Frage kann dann entscheidend werden, wenn sich trotz langer Suche nur ein fraglicher Samenfaden unter dem Mikroskop zeigt. Sicher kommt es hierbei auch auf die Erfahrung des Untersuchers an. Doch auch bei erfahrenen Untersuchern können Irrtümer auftreten. Zwar schreibt SQUILLACI: "Bis heute habe ich auf all den zahllosen Flecken, die ich untersucht habe, noch keine zelligen Elemente oder Fremdkörper gesehen, die durch ihre Form und Größe mit der typischen Gestalt der Spermatozoen verwechselt werden können!" Doch PRÄGLER meint, "daß bei geringer Anzahl von Spermien den Spermienköpfen ähnlich gestaltete Fremdkörper leicht zu einem Fehlurteil führen können. Vor allem wenn dieser Fremdkörper so auf einer Gewebefaser

liegt, daß die Begrenzung der Faser leicht für den Schwanz des angenommenen Kopfes gehalten werden kann." Dieser Fall kann tatsächlich eintreten, kam aber bei diesen Untersuchungen nur sehr selten vor. Durch die Verwendung elektiv anfärbender Farben werden diese Fehler sicher niedriger gehalten.

Von diesen Farben gibt es eine ganze Anzahl. Allein aus der Häufigkeit, mit der Untersucher bestimmte Farben durch die Jahrzehnte immer wieder zur Grundlage anderer Nachweismethoden machten, lassen sich die heute als optimal bekannten Farbstoffe herauslesen (Tabelle II). Tatsächlich zeigte sich bei unseren Nachuntersuchungen, daß sich die Spermien mit der ammoniakalischen Erythrosinlösung von CORIN und STOCKIS, mit der Säurefuchsin-Methylblau-Färbung nach BAECCHI und mit Hämalaun-Eosin besonders leicht und elektiv anfärben. Auch das Methylgrün zeigte eine starke Affinität zu Spermatozyten. Aber SQUILLACIs Karbol-Methylgrün-Pironin Lösung erwies sich als viel besser als die durch einige Tropfen Salzsäure angesäuerte Methylgrün-Lösung nach UNGAR, mit der sich die Spermien zu schwach anfärbten. Karbofuchsin, das von BOLDRINI vorgeschlagen wird, sowie das von MACAGGI benutzte Kristallviolett ergaben einen gerade noch genügenden Färbeeffect. Auch die Behandlung mit Malachitgrün und Fuchsin-S (GATTI) zeigte auf hellem Stoff eine noch ausreichende Anfärbung der Spermien. Doch auf dunklem und flauschigem Gewebe waren alle vorgenannten Farben mit Ausnahme der drei zuerst erwähnten Farbkombinationen fast immer von ungenügender Wirkung.

Die Silbernitrat-Methode von GENNARO, PERRANDOs Färbung mit Toluidinblau, JOESTENS Farbgemisch und die Färbung mit Jodjodkalium (ROUSSIN) waren aber auch auf weißem Stoff immer völlig unzureichend (Tabelle I). Entweder zeigte sich, wie bei GENNARO, überhaupt keine Farbwirkung, oder der Stoff wurde derart dunkel, daß keine Einzelheiten mehr zu erkennen waren (PERRANDO). Bei den später noch zu diskutierenden Methoden des Spermien-Nachweises am Fleckenextrakt verwendeten einige Autoren Farben und Färbungen, die an dieser Stelle schon be-

sprochen werden können. Es handelt sich hierbei um panoptische Färbungen aus der Blut- und Bakteriendiagnostik und um die zytologische Färbung nach PAPANICOLAOU. Diese färbte neben den Spermatozoen die anderen zelligen Bestandteile und Fremdkörper - die naturgemäß besonders in Ausstrichen von Zentrifugaten gehäuft auftreten - zu stark an. So war die Suche nach Spermien sehr schwierig. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der von F. STRASSMANN und G. STRASSMANN empfohlenen Färbung des Ausstriches nach GRAM erzielt. Auch hier war die Suche nach Spermien in dem dichten Film von gefärbten Bakterien und Fremdkörpern durch eine einheitliche, die Spermien nicht abhebende Färbung sehr schwierig. Die zusätzliche Überfärbung mit Säurefuchsin oder Methylblau (BAECCHI) kann sehr empfohlen werden. Hierdurch wurden die Spermien elektiv angefärbt und hoben sich gut von der Umgebung ab. Die Färbung nach MAY-GRÜNWARD, wie sie MUELLER vorschlug, erwies sich als die beste der panoptischen Methoden. Die Spermien wurden leuchtendrot gefärbt und hoben sich gut von dem bläulichen Bakterienrasen und anderen blauen Elementen ab.

Die Azur-Eosin-Färbung zeigte die Spermien rötlich angefärbt und deutlich sichtbar. Doch wurden sie blasser gefärbt als mit den Methoden von CORIN und STOCKIS und von BAECCHI. Auch die von WEDERHAKE veröffentlichte Färbung mit Krozeinscharlach war nicht so intensiv und heraushebend wie die beiden eben genannten Methoden. Kurz sei noch auf die von BOLLONE gebrauchte FEULGEN-Reaktion hingewiesen, durch die die Kohlenhydratkomponente (Pentose) der in den Spermienköpfen enthaltenen DNS erfaßt wird. In etwa der Hälfte der Präparate konnten rotgefärbte Köpfe nachgewiesen werden. Die Gewebe färbten sich überhaupt nicht an, was die Suche nach den roten Köpfen unter dem Mikroskop einfacher machte. Viele waren allerdings ohne Schwanz, oder der Schwanz war sehr schlecht zu sehen.

Die Anfärbung von morphologisch vollständigen Spermien im Stoffpräparat wie im Ausstrich mit ammoniakalischer Erythrosinlösung (CORIN und STOCKIS) oder mit dem Salzsäure-Säurefuchsin-

Methylblau-Gemisch nach BAECCHI wird von keiner anderen Färbung übertroffen. Außerdem gehören diese Färbungen zu den unkompliziertesten und schnellsten der geprüften Methoden.

2. Die Behandlung des gefärbten Gewebes

Die einfache und schnelle Färbbarkeit spielt in der Praxis eine große Rolle. Unter den erprobten Methoden gab es zum Teil sehr große Zeitunterschiede (Tabelle I). Es wurde immer wieder festgestellt, daß die Methoden, die besonders zeitraubend und umständlich waren, auch die schlechtesten Ergebnisse lieferten: HEKTOEN und RUKSTINAT, BOLDRINI, GENNARO, JOESTEN, MACAGGI, FERRANDO. Das lag zu einem großen Teil daran, daß die Flecken zu oft gespült, gewässert und in den verschiedensten Flüssigkeiten behandelt wurden. Sicher ist es sinnvoll - besonders für ältere Flecken -, die an den Geweben haftenden Spermatozoen durch Mazeration aus der Verklebung zu lösen, doch wird hier bei vielen Methoden des Guten zuviel getan. Durch zu lange Mazeration und anschließende Behandlung in zahlreichen Flüssigkeiten werden viele Spermien vorzeitig abgelöst. Völlig unnötigen Manipulationen, wie der Einschluß des gefärbten Stoffes in gelatinierte Celluloidhäutchen (BOLDRINI) oder das Aufkleben mit einer eigenen Gummilösung (FERRANDO) stehen schnelle Methoden gegenüber, die mit geringem Aufwand die besten Ergebnisse erzielen. Allerdings muß immer eines beachtet werden: der gefärbte Stoff oder Faden darf nicht sofort auf dem Objektträger eingedeckt werden. Es erwies sich immer wieder als sehr wertvoll, das Gewebe vorher mit zwei Nadeln zu zerzupfen und auszupressen. Dann konnten die Spermien, die oft in dem dichten Textilgewebe versteckt sind, an den einzelnen Fibrillen klebend oder um sie herum gelagert gesehen werden. Dieses Vorgehen ist vor allem bei dunklen und flauschigen Stoffen unbedingt nötig, wenn ein positives Ergebnis erzielt werden soll!

Der Nachweis von Spermien direkt am Stoffpräparat ist überhaupt sehr von der Farbe und Dichte des Gewebes abhängig.

In unseren Nachuntersuchungen wurden ja drei unterschiedliche Stoffarten benutzt. Dabei zeigte sich, daß alle Methoden bei den dunklen und dichten Textilgeweben schlechtere Ergebnisse hatten als am weißen Stoff. Die Methoden nach JOESTEN und BOLLONE entfärbten den Stoff. Doch während man bei BOLLONE die rotgefärbten Spermaköpfe auf diese Weise auch auf dunklem Stoff sehen konnte, waren bei der von JOESTEN angegebenen Färbung nie positive Ergebnisse zu verzeichnen. Wenn bei den Methoden, die nicht zuviel wässern und spülen, das Gewebe auf dem Objektträger zerzupft und ausgepreßt wurde, so konnte man auch hier oft Spermien beobachten. Besonders elegant ist in diesem Zusammenhang die Methode nach DZHALALOV, der am Stoff färbt und dann ein Abklatschpräparat herstellt. Hier ist natürlich die Farbe und Dichte des befleckten Stoffes völlig gleichgültig. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß man im Falle eines negativen Ergebnisses noch ein Zentrifugat von dem gefärbten Flecken herstellen kann.

Allerdings ist bei dieser Probe - wie bei allen Untersuchungen am Stoffpräparat - ein Punkt sehr wichtig: die Wahl der richtigen Seite des befleckten Stoffes. Nur bei sehr dünnem und locker gewebtem Material konnte man auch auf der "Rückseite" des Fleckes Spermien sehen. Bei dicht gewirktem oder flauschigem Gewebe dringt zwar die Flüssigkeit des Ejakulates ganz hindurch, doch bleiben die meisten Spermien auf der Oberfläche der verschmutzten Seite des Stoffes liegen. Bei Untersuchungen unter dem Mikroskop hilft auch hier wieder das Zerzupfen und Herausziehen einzelner Fäden. Nicht so einfach ist die folgende Schwierigkeit zu lösen:

Nach LEITHOFF und nach BOLLONE lagern die Spermien in einem Fleck weder am Rande noch genau in der Mitte, sondern vielmehr verteilt in einzelnen "Nestern" (BOLLONE). Dieses trifft vielleicht nicht immer auf im Laboratorium hergestellte Versuchsflecken zu, doch bei den in der gerichtlichen Medizin zu untersuchenden Flecken ist das wohl die Regel. In den Untersuchungen am Stoffpräparat und vor allem an einzelnen ausge-

zogenen Fäden kam es immer wieder vor, daß aus demselben Fleck positive und negative Ergebnisse kamen. Das läßt sich zu einem großen Teil sicher damit erklären, daß die Spermien auch in den Versuchsflecken nicht gleichmäßig verteilt waren (LEITHOFF 1964). Doch führte bei den experimentell hergestellten Flecken die mikroskopische Suche nach Spermien am ehesten im Zentrum zum Erfolg - im Gegensatz zu den Angaben von GASIS und DZHALALOV.

II. Nachweis im Fleckenextrakt

1. Die Mazeration

Bei den Nachuntersuchungen der Verfahren am Fleckenextrakt ergaben sich andere Fragen. Es werden zum Aufweichen und Herauslösen der Spermien aus dem Fleck eine Vielzahl von Flüssigkeiten und Gemischen vorgeschlagen. Destilliertes Wasser mit Zusatz von Kalilauge zum Zerstören von Epithelien gab v. HOFMANN an. 1889 schlug LIMAN zum ersten Mal stark verdünnte wässerige Ammoniaklösung vor. Auch MACAGGI, HEKTOEN und RUKSTINAT, HOLZER und MARCILLE arbeiten mit dieser Lösung. Neben verdünntem Formalin (GENNARO) und Essigsäurelösung (GLAI-STER) wird auch sehr oft mit destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung mazeriert (MUELLER, WEDERHAKE, KRATTER, DETTLING et al., DEROBERT et al.). Das von PELTZER vorgeschlagene Betupfen mit Wasserstoffsuperoxyd ergab zwar sehr schnell ein Mazerat, doch wurden zusammen mit den Spermien auch Gewebe und viele Fremdkörper herausgelöst. Die besten Ergebnisse lieferte die 0.01%ige Pankreatinlösung nach BOHNE und DIECKMANN. Das Pankreatin löst durch seine biologische Aktivität die Spermien aus ihrer Verkittung mit den Stoffasern. Auch verdünnte wässerige 1-3%ige Ammoniaklösung war allen übrigen Mazerationsflüssigkeiten noch leicht überlegen. Das von PRÄGLER vorgeschlagene Antiformin zeigte keine besonderen Vorteile. Die Unterschiede in der Wirkung aller Flüssigkeiten waren jedoch nicht groß, und auch das destillierte Wasser als Mazerationsmittel gab oft positive Ergebnisse. Eine positive Wirkung bezüglich der Zerstörung von Bakterien und Epithelien von Kalilauge, 1-2%iger Sublimatlösung oder Essigsäure konnte nicht festgestellt werden. Es muß aber betont werden, daß in diesen Untersuchungen nur verhältnismäßig frische Flecken geprüft wurden (Alter bis 8 Monate), und daß sich der Wert einer Mazerationsmethode sicher erst bei alten Flecken erweist.

So waren auch die von den Autoren angegebenen Einweichzeiten für die in unseren Untersuchungen verwendeten frischen Flecken durchweg zu lang. Eine Mazeration von maximal 8 Stunden genügte, damit sich die Spermien beim Ausdrücken oder Zentrifugieren der Flecken vom Gewebe lösten. Diese Einweichzeit entfällt natürlich bei den meisten Färbungen direkt am Stoff, da hierbei ja die Spermien am Stoff haftend gefärbt werden.

2. Das Zentrifugieren

Besonders bei den Flecken, die mit Ejakulat von niedrigem Spermatozoengehalt hergestellt waren, erwies sich das Zentrifugieren als sehr wertvoll. Hierdurch gelang eine maximale Anreicherung des Sedimentes mit Spermien. Am besten waren die von BOHNE und DIECKMANN sowie von DEROBERT, HADENGUE und LE BRETON vorgeschlagenen Zentrifugiermethoden. Hier hängt der Fleck während des Zentrifugierens noch in den Röhrchen. Bei der von BOHNE und DIECKMANN übernommenen Geschwindigkeit von 3000 U/min, die bei allen mit Zentrifugieren einhergehenden Methoden angewendet wurde, sah man in keinem Falle die von PHILIPPI beschriebenen Zerstörungen oder Verstümmelungen der Spermatozoen. Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen nach GLAISTER und der von DETTLING et al. (s.S.34) fiel auf, daß trotz gleicher Färbungen die Methode von GLAISTER einen niedrigeren Prozentsatz von positiven Ergebnissen lieferte, als die Methode nach DETTLING. Das liegt daran, daß DETTLING ein Zentrifugieren des Mazerates vorschreibt, während nach GLAISTER das mazerierte und befleckte Gewebe nur auf dem Objektträger abgestrichen wird. Bei einem spermatozoenreichen Ejakulat genügte das auch, doch bei älteren Flecken und Oligospermien wurde auf diese Weise kein positives Resultat erzielt. Durchweg zeigten die mit Zentrifugieren einhergehenden Methoden der Anfärbung eines Ausstriches die besseren Ergebnisse (s. Tabelle I). Als Nachteil wirkte sich aus, daß durch das

Zentrifugieren außer den Spermien auch viele andere korpuskuläre Elemente wie Epithelien, Bakterien, Staubteilchen und winzige Gewebsfibrillen im Sediment angereichert wurden. Diese färbten sich bei den panoptischen Färbungen sehr intensiv mit an, so daß einem ungeübten Untersucher bei der Übersichtsvergrößerung Spermatozoen entgehen können, vor allem wenn sie atypisch geformt und nur in sehr geringer Anzahl vorhanden sind. Nur die von MUELLER empfohlene Färbung nach MAY-GRÜNWALD und die mit BAECCHI-Farblösung nachgefärbte GRAM-Färbung (STRASSMANN) erwiesen sich von den aus der Hämatologie und Bakteriologie übernommenen Methoden als geeignet.

III. Die besten Methoden zur Anfärbung von Spermien

FRAENKELs Behauptung, daß im Nativpräparat Irrtümer durch Kunstprodukte eher zu vermeiden sind, als im gefärbten Präparat, trifft nach den Nachuntersuchungen mindestens für einige Methoden nicht zu. In einem gut gefärbten Präparat - sei es eine Färbung am Stoff oder ein überfärbter Ausstrich - werden Irrtümer gerade dadurch vermieden, daß die Spermien durch eine sie von der Umgebung abhebende Farbe sofort und klar zu erkennen sind. Eine gute Methode darf keine Kunstprodukte, wie z.B. Farbniederschläge, entstehen lassen. Außerdem muß sie schnell und sicher sein.

Der Vorteil der Färbungen am Stoff ist in der Tat, daß sie ohne lange Mazeration und Einweichen ausgeführt werden können. Als beste erwiesen sich hier die Färbungen nach CORIN und STOCKIS und deren Modifikationen nach ELLERMANN und KOCKEL sowie die Methode nach BAECCHI. Das in der CORIN und STOCKISschen Farblösung enthaltene Ammoniak ersetzt langes Einweichen und läßt die Spermien sich leicht vom Gewebe lösen.

Bei dichten und dunklen Stoffen und bei Ejakulaten mit wenigen Spermien waren die Ergebnisse von Färbungen an Zentrifugaten eindeutig besser als bei Färbungen direkt am Stoff. Die Methode von BOHNE und DIECKMANN, die nach BAECCHI färben, und der von DEROBERT, HADENGUE, und LE BRETON beschriebene Untersuchungsgang mit der Färbung nach CORIN und STOCKIS waren hier am besten. Hierbei spielt auch die Frage nach der Verteilung der Spermien im Fleck keine große Rolle mehr. Für Dauerpräparate als Dokumente vor Gericht eignet sich die Methode nach BOHNE und DIECKMANN allerdings nicht, da der Ausstrich durch den Gehalt an Glyzerin nicht eintrocknet.

Die empfohlenen Methoden sind sicher, einfach und erfordern keinen Aufwand. Die Farblösungen verderben bei sachgemäßer Lagerung nicht, sind lange zu verwenden und sparsam. Zugunsten der durch die erzielten Ergebnisse als optimal ausgewiesenen Methoden können alle anderen Verfahren des morphologischen Nachweises künftig als überholt betrachtet werden.

E. Zusammenfassung

Seit 100 Jahren werden Methoden zur Anfärbung von Spermatozoen in angetrockneten Ejakulaten angegeben. Die Zahl dieser Verfahren einschließlich vieler Abwandlungen beträgt heute über 50. Es wurden zunächst die einzelnen Methoden, soweit wie möglich nach ihren Originalquellen, referiert und dann an Spermaflecken vergleichend erprobt. Es wurden sowohl die Verfahren an Stoffpräparaten als auch an Fleckenextrakten nachgeprüft. Im ganzen wurden rund 500 Präparate hergestellt.

Als optimale Verfahren erwiesen sich am Flecken die Färbung nach CORIN und STOCKIS mit ammoniakalischer Erythrosinlösung sowie die Färbung nach BAECCHI mittels Säurefuchsin und Methylblau. Zur Herstellung von Fleckenextrakten ist das Verfahren von BOHNE und DIECKMANN, d.h. Pankreatinandauung des Stoffes mit nachfolgendem Zentrifugieren und Färben nach BAECCHI und die ähnliche Methode von DEROBERT u. Mitarb. am meisten zu empfehlen. Alle anderen Verfahren des morphologischen Nachweises von Spermien durch Anfärbung können künftig als überholt betrachtet werden.

Tabelle I. Ergebnisse und Zeitaufwand der einzelnen Methoden

Methode	Spermien in Millionen/ml	Zahl der Präparate	Positive absolut	Präparate in %	Zeit in Stunden
ROUSSIN	169/176/80	20	7	39	0.5
PERRANDO	169/58/70	18	-	-	72
CORIN/STOCKIS	105/59/57	20	18	90	0.5
DERVIEUX	120/72/48	22	18	82	0.5
ELLERMANN	120/78/58	20	14	70	0.5
JOESTEN	98/65/50	19	1	5	24
BAECCHI	85/85/72	18	16	89	0.6
GENNARO	98/85/69	20	-	-	24
MACAGGI A	160/100/48	12	6	50	3
B	160/100/48	12	-	-	3
HEKTOEN/RUKSTINAT	105/75/75	20	2	10	24
BOLDRINI	160/105/57	23	3	13	12
KOCKEL	160/105/70	20	17	85	0.5
DZHALALOV	98/78/70	15	12	80	0.3
GATTI	169/50/48	20	10	50	0.5
SQUILLACI	101/68/50	20	9	45	0.5
BOLLONE	110/97/48	21	10	48	2
UNGAR	105/85/65	21	10	48	9
WEDERHAKE	125/70/54	18	12	67	12-24
WINDSOR	127/67/54	18	8	44	3
GASIS	90/67/59	20	8	40	0.7
STRASSMANN	176/80/50	20	11	55	24
MUELLER	169/68/52	20	16	80	24
PELTZER	151/70/55	20	9	45	0.5
BORNAND u. B.	131/73/47	16	7	44	24
MARCILLE	121/71/45	16	9	56	3
GLAISTER	155/97/49	20	8	40	2
DETTLING et. al.	143/98/49	15	12	80	2
DEROBERET et. al.	110/80/60	20	17	85	8
BOHNE/DIECKMANN	109/85/47	22	20	91	24
HALLMANN	90/67/52	12	7	58	8
PAPANICOLAOU	90/67/52	10	5	50	9

Tabelle II. Die in der Literatur am häufigsten benutzten Farben

Ammoniakalische Erythrosin- lösung (nach CORIN und STOCKIS)	CORIN und STOCKIS	1908
	DERVIEUX	1909
	ELLERMANN	1911
	DE DOMENICIS	1912
	STRASSMANN, F.	1922
	NICOLETTI	1925
	HEKTOEN und RUKSTINAT	1928
	MARCILLE	1935
	STRASSMANN, G.	1935
	MULLER und GUIDOUX	1944
	MERKEL	1945
	DEROBERET et. al.	1950
	MUELLER	1953
	DZHALALOV	1961
Säurefuchsin-Methylblau (nach BAECCHI)	BAECCHI	1912
	GABBI	1914
	STRASSMANN, G.	1921
	KRATTER	1921
	STRASSMANN, F.	1931
	KOOPMANN	1934
	PRÄGLER	1937
	FOURCADE	1940
	NEUREITHER	1940
	BOHNE und DIECKMANN	1956
	DE BERNARDI	1959
Hämalaun-Eosin	NEUREITHER	1940
	BELONOSCHKIN	1944
	STIASNY	1944
	GLAISTER	1945
	DETTING et. al.	1951
	VASTERLING	1960
	HALLMANN	1966

F. Literatur

- BAECCHI, B.: Über eine Methode zur direkten Untersuchung der Spermatozoen auf Zeugflecken. Vjschr.gerichtl. Med. 43,1,1912
- BORNAND und BONIFAZI: Zit. nach ROSENTHALER
- BOHNE, G. und J. DIECKMANN: Zur Methodik der Identifizierung von Spermaflecken an Textilien. Z.gerichtl.Med. 44, 781, 1956
- BOLLONE, B.: La colorazione istochimica degli acidi nucleinici quale nuovo metodo per la dimostrazione morfologica degli spermatozoi nelle macchie. Min. medicoleg. 17, 87, 1967
- BOLDRINI, B.: Un nuovo metodo universale per la dimostrazione degli spermatozoi nelle macchie. Boll.Soc.med.-chir. Modena 38, 197, 1938; Ref.Z.gerichtl.Med.33, 155, 1940
- CHAUMONT, A. et E. WELL: Les méthodes actuelles d'identification du sperme. Rev.int.Criminol. 9, 288, 1955
- CORIN, G. et E. STOCKIS: Nouvelle méthode de recherches de taches spermatiques. Arch.Anthrop.crim. 180, 1908 (zit. nach SCHWARZACHER)
- DE BERNARDI, A.: Perfezionamento di tecnica per l'esame morfologico di macchie di sperma su stoffa: allestimento di preparati con nastro adesivo scotch. Min. medicoleg. 79, 36, 1959
- DEROBERTE, L., A. HADENGUE et R. LE BRETON: Nouvelle technique pour la recherche des spermatozoides dans les taches. Ann. méd. lég. 30, 387, 1950
- DERVIEUX, F.: Recherche directe des spermatozoides sur la linge, les étoffes blanches et le bois. Ann. hyg. méd. lég. 12, 210, 1909 (zit. nach CHAUMONT et WELL)

- DETTLING, L., S. SCHÖNBERG
und F. SCHWARZ: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin,
Basel (Karger) 1951
- DZHALALOV, D.: The Possibility of Spermatozoon
in the Prints of Sperm Stains.
Sud.med.Ekspert. 1, 36, 1961;
Ref.Z.gerichtl.Med. 54, 106, 1963
- ELLERMANN, D.: Vjschr.gerichtl.Med. 42, 116, 1911
(zit. nach SCHWARZACHER)
- ELLIS, H.: Recovery of Spermatozoa from
Semen Stains.
Am.J.Clin.Pathol. 1, 95, 1960
- FRAENCKEL, P.: Die Untersuchung von Samenspuren
an Objekten. in: LOCHTE, T.:
Gerichtsärztliche und polizeiärzt-
liche Technik, Wiesbaden (Berg-
mann) 1914
- GASIS, T.: Zur Auffindung der Spermatozoen
in alten Spermaflecken.
Dtsch.med.Wschr. 1910, 1367
(zit. nach LEITHOFF 1965)
- GATTI, R.: Un nuovo metodo di colorazione
degli spermatozoi.
Min.medicoleg. 83, 33, 1963
- GENNARO, A.: Sul metodo al nitrato d'argento
per la dimostrazione degli sperma-
tozoi.
Arch.med.leg. 2, 115, 1923;
Ref.Z.gerichtl.Med. 5, 690, 1925
- GLAISTER, J.: Medical Jurisprudence and Toxi-
cology, Edinburgh (Livingstone)
1945
- GRIGORJEW, A.: Zur Frage der Technik feiner Unter-
suchung von Blut und Sperma.
Vjschr.gerichtl.Med. 2, 82, 1902
(zit. nach PHILIPPI)
- GÜTLINGEN, A.v.: Vergleichende Untersuchungen über
die Brauchbarkeit von Spermiennach-
weismethoden an Flecken, besonders
der papierchromatographischen Ver-
fahren.
Diss. Bonn 1961
- HALLMANN, L.: Klinische Chemie, ¹⁰Stuttgart
(Thieme) 1966
- HEKTOEN, L. and
G. RUKSTINAT: Identification of Human Seminal
Stains.
Arch.Pathol. 6, 96, 1928

- HOFMANN, C.v.: Lehrbuch der Gerichtlichen Medizin,
Wien (Urban und Schwarzenberg)
1891
- HOLZER, L.: Sperma und Spermaflecken, in:
NEUREITHER, F.v., F. PIETRUSKY und
E. SCHÜTT: Handwörterbuch der ge-
richtlichen Medizin, Berlin
(Springer) 1940
- JOESTEN, J.: Münch.med.Wschr. 34, 1817, 1911
(zit. nach SCHWARZACHER)
- KLÜMPEN, W.: Untersuchungen zur Spermaflecken-
diagnose durch papierchromato-
graphischen Spermin-Cholin-Nachweis
mit Anti-Humansamenplasma-Serum
und mittels CPK-Nachweises.
Diss. Marburg 1967
- KRATTER, J.: Lehrbuch der Gerichtlichen Medizin,
Stuttgart (Enke) 1921
- LEITHOFF, H.: Neue Methoden der gerichtsmedizi-
nischen Untersuchungen von Sperma-
flecken.
Fortschr.Med. 1964, 493
- LEITHOFF, H. und
J. LEITHOFF: Die Verteilung der sauren Phos-
phatase und der Spermien im Sperma-
fleck.
Acta.med.leg. 18, 47, 1965
- LIMAN, C.: CASPERs Handbuch der Gerichtlichen
Medizin, Berlin (Hirschwald) 1889
- MACAGGI, D.: Un nuovo metodo di colorazione
degli spermatozoi.
Pathologica 393, 187, 1925;
Ref.Z.gerichtl.Med. 6, 469, 1926
- MARCILLE: Zit. nach ROSENTHALER
- MARIQUE, E.: Nouveau procédé pour la recherche
des spermatozoides.
Arch.int.méd.lég. 1, 3, 1910
(zit. nach KLÜMPEN)
- MUELLER, B.: Zur Technik des Spermanachweises.
Z.gerichtl.Med. 6, 386, 1926
- MUELLER, B.: Gerichtliche Medizin,
Berlin (Springer) 1953
- PELTZER: Zit. nach ROSENTHALER
- PERRANDO, G.: Dimostrazione nelle macchie sperma-
tiche per inclusione in gomma delle
zone macchiate.
(zit. nach BOLLONE)

- PHILIPPI, H.: Vergleichende Untersuchungen über die Wertigkeit der Methoden zum Nachweis von Spermaflecken in Textilien.
Diss. Bonn 1952
- POLLAK, O.: Samen and Seminal Stains.
Arch.Pathol. 35, 140, 1943
(zit. nach ELLIS)
- PRÄGLER, K.: Eine neue Methode zum forensischen Spermanachweis.
Z.gerichtl.Med. 27, 143, 1937
- PROKOP, O.: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin,
Berlin (Volk und Wissen) 1960
- ROSENTHALER, L.: Toxikologische Mikroanalyse,
Berlin 1935
- ROUSSIN, M.: Ann.hyg.méd.lég. 27, 142, 1867
(zit. nach DE BERNARDI)
- SCHWARZACHER, W.: Die Methoden der forensischen Spermauntersuchungen, in:
ABDERHALDENs Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 4,
Teil 12, 184 (1931)
- SQUILLACI, G.: L'application d'un colorant employé en histologie en des fins d'identification des spermatozoides dans des taches de sperme sur des étoffes.
Acta.med.leg. 17, 69, 1964
- STRASSMANN, F.: Der menschliche Samen in der gerichtlichen Medizin.
Abh.Sex.forsch. 2, 32, 1922
- STRASSMANN, F.: Lehrbuch der Gerichtlichen Medizin,
²Stuttgart (Enke) 1931
- STRASSMANN, G.: Grundriß der gerichtlichen Medizin,
^{3/4}Berlin (Seemann) 1935
- UNGAR, E.: Zum Nachweis der Spermatozoen im eingetrockneten Fleck.
Vjschr.gerichtl.Med. 46, 316, 1887
(zit. nach v. HOFMANN)
- VASTERLING, H.: Praktische Spermatologie,
Stuttgart (Thieme) 1960
- WEDERHAKE, E.: Zur Untersuchung menschlicher Samenflecke für gerichtliche Zwecke.
Dtsch.med.Wschr. 1, 997, 1905
- WINDSOR, F.: Brit.Med.J. 2, 501, 1908
(zit. nach HEKTOEN und RUKSTINAT)

Herrn Prof. Dr. Schleyer danke ich für die Überlassung des Themas und seine Beratung bei den Versuchen und der Ausarbeitung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 12. September 1940 wurde ich, Justus Engelhardt, als erster Sohn des Oberstabsarztes Dr. med. Johannes Engelhardt und seiner Ehefrau Margaretha, geb. Sabiel, in Hamburg geboren. Von 1947 bis 1960 besuchte ich zuerst die Volksschule und dann den humanistischen Zweig der Hansaschule, Gymnasium für Jungen, in Hamburg-Bergedorf. Nach dem Ablegen der Reifeprüfung am 1. Februar 1960 war ich für zwei Jahre Soldat bei der Panzeraufklärungstruppe in Eutin und in Ingolstadt.

Im Sommersemester 1962 begann ich in Hamburg das Medizinstudium. Dort bestand ich im April 1963 die naturwissenschaftliche und am 28. April 1965 die ärztliche Vorprüfung. Im Sommersemester 1965 begann ich mein klinisches Studium an der Philipps-Universität in Marburg. Das Sommersemester 1966 studierte ich wieder in Hamburg und kehrte dann im Wintersemester 1966/67 nach Marburg zurück. Hier möchte ich nach Abschluß meines Studiums nach dem Wintersemester 1967/68 mein Staatsexamen ablegen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

In Hamburg

Bautzmann, Bartelheimer, Beckermann, Bethge, Bierich,
Bleichert, Bochnik, Bürger-Prinz, Fischer, K., Fleischhauer
Grüttner, Harders, Harmsen, Heinrich, Horstmann, Kühnau,
Landbeck, Lierse, Lindner, Malorny, Mittelstraß, Nickol,
Prinz, Reichel, Schäfer, Schuchhardt, Seifert, Stelzner,
Wartenberg, Weiss, Wulf.

In Marburg

Braun-Falco, Buchholz, Berendes, Bommer, Dittrich, Dölle,
Exner, Ganz, Gedigk, Hamm, Jacob, Knauff, Korb, Lang,
Linneweh, Löhr, Mann, Martini, Marx, du Mesnil de Rochemont,
Neubauer, Petzold, Pots, Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer,
Schmid, Schlosser, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Siess,
Spiegelberg, Straub, Streicher, Strohmeier, Voss, Würterle.

